

ZWEI-PHOTONEN-POLYMERISATION
ALS METHODE ZUR HERSTELLUNG
MEDIZINTECHNISCHER FUNKTIONSELEMENTE



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Vom Fachbereich Physik
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von
M. Sc. Anika Trautmann
aus Aschaffenburg

Referent: Prof. Dr. Thomas Walther
Korreferent: Prof. Dr. Ralf Hellmann

Tag der Einreichung: 12.11.2018
Tag der Prüfung: 12.12.2018

Darmstadt 2018
D17

Trautmann, Anika: *Zwei-Photonen-Polymerisation als Methode zur Herstellung medizintechnischer Funktionselemente*,
Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,
Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2019
Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2018

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International
<https://creativecommons.org/licenses/>

KURZZUSAMMENFASSUNG

Zur Anfertigung von komplexen dreidimensionalen Strukturen für Anwendungen in der Photonik, Mikrofluidik oder Medizintechnik sind dreidimensionale Lithografieverfahren von besonderer Bedeutung. Eine vielversprechende Methode ist dabei das Laserdirektschreiben mittels Zwei-Photonen-Polymerisation. Diese ermöglicht es innerhalb eines Prozessschritts dreidimensionale Strukturen mit einer Genauigkeit im Submikrometerbereich zu generieren. Dafür wird ein Laserstrahl mit einer Wellenlänge, die sich für Zwei-Photonen-Polymerisation eignet, in ein fotoempfindliches Material fokussiert. Im Bereich des Fokus kommt es bei einer ausreichend hohen Strahlungsintensität zu einer punktuellen Modifikation des Materials. Durch Verfahren des Fokus im Material können zuvor definierte dreidimensionale Objekte präzise angefertigt werden. Das Laserdirektschreiben mittels Zwei-Photonen-Polymerisation hat somit den Vorteil, dass beliebige Formen unabhängig von einer Schicht für Schicht Herstellung und mit einer hohen Genauigkeit hergestellt werden können. Die charakteristische punktuelle Aushärtung des Materials und die daraus resultierende lange Herstellungszeit für makroskopische Objekte begrenzen bislang jedoch die Anwendbarkeit.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zwei-Photonen-Polymerisation als Methode zur Herstellung medizintechnischer Funktionselemente verwendet und zugleich betrachtet, wie der Herstellungsprozess dabei deutlich optimiert und mit weiteren Methoden in hybriden Verfahren kombiniert werden kann. Zunächst wurde vertiefend auf den Herstellungsprozess eingegangen. Dabei wurde das Gesamtsystem zur Fertigung von dreidimensionalen Objekten verbessert und das Polymerisationsverhalten verschiedener fotoempfindlicher Materialien untersucht. Zudem wurden Konzepte zur Optimierung des Verfahrens betrachtet. Es wurde eine zeitsparende Single-line single-pass Schreibtechnik zur Herstellung von makroskopischen Gerüststrukturen umgesetzt. Das Verhalten von Fibroblasten auf diesen Strukturen wurde studiert und Zelladhäsion, Zellproliferation und dreidimensionales Zellwachstum beobachtet. Durch die Vereinigung des Laserdirektschreibens von Mikronadeln und des Erzeugens von Mikrokanälen mittels Ultrakurzpuls laser wurde überdies ein neuer aussichtsreicher Ansatz zur Herstellung mikronadelbasierter Systeme demonstriert. Ein in dieser Arbeit präsentiertes hybrides Verfahren, welches Laserdirektschreiben und Stereolithografie kombiniert, ermöglicht darüber hinaus eine präzise und schnelle Fertigung von makroskopischen dreidimensionalen Objekten mit hochaufgelösten funktionalen Merkmalen und erweitert damit das Anwendungsspektrum der Zwei-Photonen-Polymerisation im Bereich der Medizintechnik.

ABSTRACT

Three-dimensional lithography processes enable the fabrication of complex three-dimensional structures for photonic, microfluidic or medical applications. Laser direct writing via two-photon polymerization is a promising method to realize these structures. It is used to generate three-dimensional structures with an accuracy of sub-micrometer during a single process step. A laser beam with a wavelength suitable for two-photon polymerization is focused into a photosensitive material. If the light intensity around the focal point is high enough, the material is polymerized by pinpoint modification. Three-dimensional pre-defined structures are precisely fabricated by moving the focal point through the material. Thus, the advantages of laser direct writing via two-photon polymerization are high precision and a fabrication of arbitrary structures regardless of layer by layer fabrication. Nevertheless, the point-by-point fabrication leads to high production times and so far limits the applicability.

In the present thesis, two-photon polymerization has been used as a method to fabricate medical devices. Significant improvements in the fabrication process and the combination of this method in hybrid approaches are shown. The two-photon polymerization process, several photosensitive materials and new concepts for optimizing the process are addressed. Furthermore, a fast single-line single-pass fabrication process is introduced to fabricate macroscopic scaffolds. A cell study analyzes the cellular behavior of fibroblasts on these scaffolds and demonstrates cell adhesion, proliferation, and three-dimensional cell growth. Moreover, combining femtosecond direct laser written microneedles with femtosecond laser generated microfluidic channels provides a novel and important approach in the field of microneedle-based microfluidic systems. In addition, this thesis presents a process combining two-photon polymerization and stereolithography for precise and fast fabrication of macroscopic three-dimensional structures featuring microscale and nanoscale characteristics. This hybrid process extends the applicability of the process towards larger medical devices.

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mir diese Arbeit zugetraut und durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Diese Arbeit wäre ohne euch nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank geht an meine betreuenden Professoren, Ralf Hellmann und Thomas Walther, die sich immer Zeit für Fragen nehmen und mir mit Ihren Ideen, Ihrem Wissen und Ihrer Erfahrung zur Seite stehen. Sie gaben mir die Möglichkeit viel zu lernen und mich weiterzuentwickeln. Ich bin jetzt schon wehmütig, dass ich bald kein Mitglied Ihrer Arbeitsgruppen mehr bin.

An dieser Stelle auch vielen Dank an alle Arbeitsgruppenmitglieder in Darmstadt, Obernburg und Aschaffenburg. Ich danke den Kollegen, die mich herzlich an der Hochschule aufgenommen haben und mich schnell zu einem festen Mitglied in der Arbeitsgruppe machten. Ebenso danke ich den Darmstädter Kollegen, dass sie mich weiterhin als Gruppenmitglied ansahen und bei den Arbeitsgruppenevents einbezogen. Ich danke Jürgen Knöll für die unzähligen kleinen Hilfestellungen, vor allem am Anfang, als noch weniger Kollegen in Obernburg waren. Ich danke Stefan Belle für die Einführung in das Thema Zwei-Photonen-Polymerisation und die Diskussionen zu diesem Thema. Ich danke Benedikt Adelmann und Manuel Rosenberger für die vielen Tipps und Ratschläge. Zusammen mit Maiko Girschikofsky hat Manuel mir den entscheidenden Nachbearbeitungsschritt für die Gerüststrukturen geliefert. Ich danke Maiko zudem für die Beantwortung meiner vielen Fragen zu den Ormoceren. Ich danke Steffen Hessler für die Beantwortung weiterer Fragen zu fotoempfindlichen Materialien und das Ausleihen des Microfluidic Kits. Ich danke Gian-Luca Roth für die Unterstützung bei der Erstellung der mikronadelbasierten Systeme, die er mir zuliebe auch anderen Arbeiten vorgezogen hat. Ich danke in diesem Zusammenhang auch Stefan Rung, Simon Schwarz und Julian Zettl für die vielen kleinen Arbeiten an der UKP-Anlage. Ich danke Babette Götzendorfer für die vielen und am Ende erfolgreichen Beschichtungsversuche. Ich danke Kevin Rutsch für die Unterstützung bei der Umsetzung einer Schaltung zur Umwandlung des Spannungssignals. Ich danke Alexander Pacuraru, Michael Bachmann und Benedikt Nujiqi für die Mitarbeit am Projekt im Rahmen von Bachelor- und Masterarbeiten. Ich danke Max Schleier für das Grillen im Garten und die Möglichkeit dort die lieben Aschaffenburg Kollegen zu treffen. Ich danke den alp-Damen für den Austausch bei unseren Abendessen. Ich danke Herrn Hellmann und den Kollegen für eine schöne Zeit in Mölten, beim Indoor-Minigolf und allen anderen Aktivitäten neben der Arbeit, die immer eine Bereicherung waren.

Darüber hinaus möchte ich mich bei den Firmen Optec, Menlo und ExcorLab für die gute Zusammenarbeit und die Ratschläge, Ideen und Unterstützung bis hin zur Durchführung von Zellversuchen und das zur Verfügung stellen eines weiteren Lasers bedanken.

Zudem danke ich Ralf Hellmann, Thomas Walther, Karen Böhling, Babette Götzen-dorfer, Stefan Belle und Gian-Luca Roth für das Korrekturlesen und Verbessern von Veröffentlichungen, Postern, Anträgen und dieser Arbeit.

Ich bin dankbar für den Rückhalt und die fortwährende Unterstützung meiner Familie und meiner Freunde. Ich danke meinen Eltern, die mich immer in meinen Entscheidungen unterstützt haben und mich motivierten zu studieren. Ich danke Barbara und meinem Bruder, dass ich jederzeit vorbeikommen durfte und dann meistens auch noch etwas Leckeres zum Essen bekam. Ich danke meiner Großmutter Hannelore für Ihre weisen Ratschläge und die prägenden Worte „Was man im Kopf hat, das kann einem keiner nehmen“, die mich beim Erstellen dieser Arbeit immer begleiteten und die ich nun ergänzen möchte mit „...und was man davon aufschreibt, bleibt über die Zeit erhalten.“ Ich danke meinen Schwiegereltern für die Aufnahme in Ihre Familie und die großartige Unterstützung bei so vielen Dingen. Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Mann Nils, der mir die ganze Zeit beistand, mir den nötigen Halt gab und mich zur richtigen Zeit motivierte, wenn ich zweifelte.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LASERDIREKTSCHREIBEN MITTELS ZWEI-PHOTONEN-POLYMERISATION .	5
2.1	Zwei-Photonen-Absorption	5
2.2	Zwei-Photonen-Polymerisation	6
2.2.1	Intensitätsverteilung im Bereich des Fokus	7
2.2.2	Fotochemische Reaktion	10
2.2.3	Fotoempfindliche Materialien	12
2.3	Vergleich mit anderen Direktschreibtechniken	15
2.3.1	Materialauftragende Techniken	15
2.3.2	Teilchenstrahlbasierte Techniken	17
2.3.3	Laserbasierte Techniken	17
2.4	Anwendungsgebiete	18
2.4.1	Photonik	19
2.4.2	Messtechnik	19
2.4.3	Mikrofluidik	20
2.4.4	Medizintechnik	20
3	ÜBERBLICK ÜBER DAS GESAMTSYSTEM	23
3.1	System mit zwei Ultrakurzpulslasern	23
3.2	Verbesserungen am System	25
3.3	Systemerweiterungen	28
3.3.1	Räumlicher Lichtmodulator	28
3.3.2	Ultrakurzpulslaser mit variabler Repetitionsrate und Pulslänge . .	29
3.3.3	Laser für Stereolithografie mittels linearer Absorption	29
3.4	Zusammenfassung	30
4	HERSTELLUNGSPROZESS	33
4.1	Polymerisationsverhalten verschiedener Materialien	33
4.1.1	Transmissions- und Reflexionsmessung	34
4.1.2	Bestimmung geeigneter Prozessparameter	35
4.1.3	Auflösungsgrenze von Strukturen aus OrmoComp®	39
4.2	Nichtlineare Absorptionsordnung	41
4.2.1	Grundlagen	41
4.2.2	Experimentelle Ergebnisse	42
4.3	Prozessoptimierung durch Strahlmodulation	45
4.3.1	Funktionsweise eines räumlichen Lichtmodulators	45
4.3.2	Methoden zur Generierung von Hologrammen	46
4.3.3	Strahlmodulation	48
4.4	Zusammenfassung	49
5	GERÜSTSTRUKTUREN FÜR ZELLSTUDIEN MIT HUMANEN FIBROBLASTEN	53
5.1	Design und Herstellung von Gerüststrukturen	53
5.1.1	Single-line single-pass Schreibtechnik	54
5.1.2	Laserdirektschreiben von Gerüststrukturen	55

5.2	Experimentelle Ergebnisse der Zellstudien	55
5.2.1	Toxizität des Materials	56
5.2.2	Adhäsion und Proliferation von humanen Fibroblasten	61
5.3	Zusammenfassung	67
6	VEREINIGUNG VON LASERDIREKTSCHREIBEN UND STEREOLITHOGRAFIE	69
6.1	Kombinierte Verfahren mit Zwei-Photonen-Polymerisation	69
6.1.1	Vorstellung verschiedener Strategien	70
6.1.2	Hybrides Konzept für Laserdirektschreiben und Stereolithografie .	71
6.2	Umsetzung eines kombinierten Fertigungsverfahrens	75
6.2.1	Hybrider Herstellungsprozess	75
6.2.2	Gerüststrukturen in einer äußeren Hülle	77
6.2.3	Fluidisches System	81
6.3	Zusammenfassung	81
7	MIKRONADELN	83
7.1	Herstellung von mikronadelbasierten Systemen	84
7.1.1	Laserdirektschreiben von Mikronadeln	84
7.1.2	Erzeugen von Kanälen	85
7.1.3	Anfertigung eines kombinierten Systems	86
7.2	Experimentelle Ergebnisse zur Anwendbarkeit	86
7.2.1	Stabilität der Mikronadeln	86
7.2.2	Funktionalität des mikrofluidischen Systems	89
7.2.3	Optimierung des Fertigungsprozesses	90
7.3	Zusammenfassung	91
8	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	93
8.1	Zusammenfassung	93
8.2	Ausblick	94
	Appendix	97
A	ANHANG	97
A.1	Prozessfenster	97
A.2	Schaltplan	99
A.3	Betragsquadrat der Feldkomponenten	100
	Literaturverzeichnis	103
	Curriculum Vitæ	119
	Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge	121

EINLEITUNG

Die optische Lithografie ist eine Schlüsseltechnologie unserer Zeit, die unsere Gesellschaft maßgeblich beeinflusst. Kompakte Computer und Mobiltelefone gibt es nur, weil mittels Photolithografie kleine, leistungsstarke und energieeffiziente Mikrochips hergestellt werden können. Nur durch eine aufwändige Maskenbelichtung ist es möglich feinste Strukturen innerhalb dieser Mikrochips zu erzeugen. Dieses Herstellungsverfahren ist jedoch auf eine zweidimensionale, flächige Belichtung innerhalb eines Belichtungsschritts limitiert. Zur Anfertigung von komplexen dreidimensionalen Strukturen für Anwendungen in der Photonik, Mikrofluidik oder Medizintechnik sind deshalb dreidimensionale Lithografieverfahren von besonderer Bedeutung. [1, 2]

Eine vielversprechende Methode ist dabei das Laserdirektschreiben mittels Zwei-Photonen-Polymerisation. Diese ermöglicht es innerhalb eines Prozessschritts dreidimensionale Strukturen mit einer Genauigkeit im Submikrometerbereich zu generieren. Dafür wird ein Laserstrahl mit einer Wellenlänge, die sich für Zwei-Photonen-Polymerisation eignet, in ein fotoempfindliches Material fokussiert. Im Bereich des Fokus kommt es bei einer ausreichend hohen Strahlungsintensität zu einer punktuellen Modifikation des Materials. Durch Verfahren des Fokus im Material können zuvor definierte dreidimensionale Objekte präzise angefertigt werden. [3]

Das Laserdirektschreiben mittels Zwei-Photonen-Polymerisation hat somit den Vorteil, dass beliebige Formen unabhängig von einer Schicht für Schicht Herstellung und mit einer hohen Genauigkeit hergestellt werden können. Die charakteristische punktuelle Aushärtung von Material und die daraus resultierende lange Herstellungszeit für makroskopische Objekte begrenzen jedoch die Anwendbarkeit. Um dies zu überwinden gibt es bereits mehrere Ansätze die Zwei-Photonen-Polymerisation mit anderen schnelleren Verfahren zu kombinieren [4, 5]. In dieser Arbeit wird eine weitere aussichtsreiche Methode betrachtet, welche Zwei-Photonen-Polymerisation und Stereolithografie in einem effizienten hybriden Verfahren kombiniert.

Die fotoempfindlichen Materialien, die für eine Zwei-Photonen-Polymerisation in Frage kommen, sind meistens nach der Polymerisation mechanisch stabil und zeigen häufig Biokompatibilität. Das führt dazu, dass mit Materialien wie dem Hybridpolymer OrmoComp[®] unter anderem an der Herstellung von verschiedenen Funktionselementen für die Medizintechnik geforscht wird [6]. Dazu zählen Mikronadeln für eine schmerzfreie und minimalinvasive Medikamentengabe und dreidimensionale Gerüststrukturen für ein kontrolliertes Zellwachstum, welche im Rahmen dieser Arbeit mittels Zwei-Photonen-Polymerisation hergestellt wurden.

Mikronadeln bieten eine Alternative zu Injektionsnadeln, die sehr häufig bei der Verabreichung von Medikamenten und der Entnahme von Körperflüssigkeiten zum Einsatz kommen. Dabei können Mikronadeln nicht nur zur Gabe von Impfungen, Insulin oder Hormonen verwendet werden, wie zahlreiche Studien zeigen, sondern auch

zur Blutentnahme oder als Biosensor. Die Herstellung von geeigneten mikronadelbasierten Systemen ist nach wie vor sehr aufwändig und Bestandteil aktueller Forschung, da viele Kriterien zu erfüllen sind. Die Nadeln selbst müssen zum einen stabil sein, um unversehrt das Eindringen in die Haut zu überstehen, zum anderen sollen sie schmal genug sein, um ein schmerzfreies und minimalinvasives Eindringen in die Haut zu gewährleisten. Zudem müssen die Nadeln in der Lage sein in angemessener Zeit ausreichende Mengen an Wirkstoff in die Haut oder Körperflüssigkeit aus der Haut transportieren zu können. Ein wichtiger Faktor, der dabei nicht vernachlässigt werden darf, ist die Biokompatibilität des Materials, aus welchem die Mikronadeln bestehen. Die Zwei-Photonen-Polymerisation ist dazu in der Lage all diesen Herstellungskriterien nachzukommen. [7, 8]

In gleichem Maße ist die Zwei-Photonen-Polymerisation eine prädestinierte Methode um dreidimensionale Gerüststrukturen für die Gewebezucht anzufrachten. Es ist bekannt, dass das Wachstumsverhalten von Zellen direkt durch ihre Umgebung, auch von mikroskopischen Strukturen, beeinflusst wird. Neben besonderen Voraussetzungen, die notwendig sind, um die zellularen Funktionen aufrecht zu erhalten, gibt es weitere Funktionen, welche Auswirkung auf die Adhäsion, Ausrichtung, Migration und Proliferation von Zellen haben. Der genaue Einfluss unterschiedlicher Faktoren ist jedoch nicht vollständig verstanden und Teil aktueller Forschung. Die Zwei-Photonen-Polymerisation ermöglicht es reproduzierbare Gerüststrukturen mit präziser Ausarbeitung anzufrachten, welche einfach in ihrer Form modifiziert werden können und das Potenzial haben zukünftig als Grundlage für kontrolliertes dreidimensionales Zellwachstum zu dienen. [9–11]

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Zwei-Photonen-Polymerisation als Methode zur Herstellung solcher medizintechnischer Funktionselemente und betrachtet zugleich, wie der Herstellungsprozess dabei deutlich optimiert und mit weiteren Methoden in hybriden Verfahren kombiniert werden kann. Zunächst wird auf die Zwei-Photonen-Polymerisation vertiefend eingegangen. Dabei werden das Gesamtsystem zur Fertigung von dreidimensionalen Objekten, das Polymerisationsverhalten verschiedener fotoempfindlicher Materialien und Konzepte zur Optimierung des Verfahrens vorgestellt.

Anschließend liegt der Fokus auf der Anfertigung von medizintechnischen Funktionselementen. Es wird eine zeitsparende Single-line single-pass Schreibtechnik zur Herstellung von makroskopischen Gerüststrukturen eingeführt und das Verhalten von Zellen auf diesen Strukturen untersucht. Durch die Vereinigung des Laserdirektschreibens von Mikronadeln und des Erzeugens von Mikrokanälen mittels Ultrakurzpulslaser wird überdies ein neuer Erfolg versprechender Ansatz zur Herstellung mikronadelbasierter Systeme gezeigt. Ein in dieser Arbeit präsentiertes hybrides Verfahren, welches Laserdirektschreiben und Stereolithografie kombiniert, ermöglicht zudem eine präzise und schnelle Fertigung von makroskopischen dreidimensionalen Objekten mit hochaufgelösten funktionalen Merkmalen und erweitert damit das Anwendungsspektrum der Zwei-Photonen-Polymerisation im Bereich der Medizintechnik.

Diese Punkte werden in den nächsten sieben Kapiteln in folgender Untergliederung behandelt.

KAPITEL 2 befasst sich mit der theoretischen Beschreibung der Zwei-Photonen-Absorption und der Zwei-Photonen-Polymerisation in fotoempfindlichen Materialien. Dabei werden die für eine fotochemische Reaktion benötigte Strahlungsintensität, die fotochemische Reaktion selbst und unterschiedliche fotoempfindliche Materialien betrachtet. Darüber hinaus werden in einem Vergleich mit anderen Technologien die Vor- und Nachteile der Zwei-Photonen-Polymerisation herausgearbeitet. Ein Überblick über die aktuellen Anwendungsgebiete veranschaulicht abschließend die vielseitigen Einsatzmöglichkeiten des Laserdirektschreibens mittels Zwei-Photonen-Polymerisation.

KAPITEL 3 präsentiert das Gesamtsystem zur Fertigung von dreidimensionalen Objekten. Dabei wird auch näher auf durchgeführte Verbesserungen am Aufbau und auf Systemerweiterungen für einige der Untersuchungen eingegangen.

KAPITEL 4 behandelt das Polymerisationsverhalten verschiedener Materialien und geht anschließend auf die Bestimmung von optimalen Prozessparametern ein. Für die Hybridpolymere OrmoCore, OrmoClad und OrmoComp[®] wird für eine Wellenlänge von 515 nm zudem die nichtlineare Absorptionsordnung experimentell ermittelt. Abschließend beschäftigt sich dieses Kapitel mit der Verwendung eines räumlichen Lichtmodulators.

KAPITEL 5 stellt eine Single-line single-pass Technik vor, mit welcher eine signifikante Zeitersparnis bei der Herstellung makroskopischer Gerüststrukturen mit unterschiedlicher Porengröße erzielt werden kann. Zudem wird das Wachstumsverhalten von Fibroblasten an Strukturen aus OrmoComp[®] betrachtet und hierbei auf die Punkte Toxizität der Strukturen, Zelladhäsion und Zellproliferation eingegangen. Es wird gezeigt, dass große Gerüststrukturen aus OrmoComp[®] aufgrund des beobachteten vertikalen und horizontalen Wachstums der Zellen ein vielversprechendes Potenzial für weiterführende Zellwachstumsstudien direkt an der Struktur ohne zusätzliche unterstützende Proteinbeschichtungen haben.

KAPITEL 6 beschreibt ein hybrides Verfahren, welches im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde und Zwei-Photonen-Polymerisation und Stereolithografie in einem Aufbau und gemeinsamen Herstellungsverfahren vereint. Eine erste erfolgreiche Umsetzung dieses innovativen Ansatzes wird am Beispiel von Gerüststrukturen in einer äußeren Hülle demonstriert. Zudem wird anhand eines fluidischen Systems gezeigt, dass der hybride Prozess für unterschiedliche Anwendungen geeignet ist.

KAPITEL 7 geht auf einen hybriden Ansatz ein, welcher mittels Laserdirektschreiben gefertigte Mikronadeln mit mikrofluidischen Kanälen, generiert durch ultrakurze Laserpulse, kombiniert. Es wird gezeigt, dass ein Lasersystem zur Herstellung von Mikronadeln und Mikrokanälen ausreicht. Die Anwendbarkeit der angefertigten mikronadelbasierten Systeme wird anhand eines Druckversuchs und eines Durchflusstests demonstriert.

KAPITEL 8 fasst abschließend die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen und gibt einen Ausblick zur Weiterentwicklung des Herstellungsprozesses mittels Zwei-Photonen-Polymerisation und hybrider Verfahren mit Ultrakurzpulslaser, die das

Potenzial haben die Anfertigung von medizintechnischen Funktionselementen über diese Arbeit hinausgehend zu verbessern.

LASERDIREKTSCHREIBEN MITTELS ZWEI-PHOTONEN-POLYMERISATION

Das Laserdirektschreiben mittels Zwei-Photonen-Polymerisation ist ein Verfahren um dreidimensionale Objekte mit einer Auflösung im Bereich von Mikro- bis hin zu mehreren zehn Nanometern anzufertigen. Hierzu werden die Eigenschaften von fotoempfindlichen Materialien durch Bestrahlung mit geeignetem Licht, welches innerhalb des Materials nichtlinear absorbiert wird, verändert. Grundlage für dieses Verfahren bilden die theoretischen Überlegungen von Maria Göppert-Mayer zur Zwei-Photonen-Absorption aus dem Jahre 1929 [12].

In diesem Kapitel wird auf die theoretische Beschreibung der Zwei-Photonen-Absorption und die Zwei-Photonen-Polymerisation in fotoempfindlichen Materialien näher eingegangen. Dabei werden die für eine fotochemische Reaktion benötigte Strahlungsintensität, die fotochemische Reaktion selbst und unterschiedliche fotoempfindliche Materialien betrachtet. Damit dient dieses Kapitel als Grundlage für alle weiterführenden Untersuchungen in den nachfolgenden Kapiteln. Darüber hinaus werden in einem Vergleich mit anderen Technologien die Vor- und Nachteile der Zwei-Photonen-Polymerisation herausgearbeitet. Ein Überblick über die aktuellen Anwendungsgebiete veranschaulicht abschließend die vielseitigen Einsatzmöglichkeiten des Laserdirektschreibens mittels Zwei-Photonen-Polymerisation.

2.1 ZWEI-PHOTONEN-ABSORPTION

Die Zwei-Photonen-Absorption wurde von Maria Göppert-Mayer bereits 1929 beschrieben. Ein Atom im Grundzustand n kann nicht nur von einem Photon ν_{nm} sondern auch von zwei Photonen ν und ν' in einen angeregten Zustand m mit der Energie $h\nu_{nm}$ gebracht werden (siehe Abbildung 2.1), wenn die Summe $h\nu + h\nu' = h\nu_{nm}$ der Anregungstufe des Atoms entspricht. Dabei werden die beiden Photonen ν und ν' quasi simultan absorbiert, wobei die Absorption des Photons ν das Atom in einen virtuellen Zwischenzustand k hebt und die Absorption des Photons ν' das Atom in den angeregten Zustand m bringt. [12]

Der Prozess der Zwei-Photonen-Absorption lässt sich sowohl quantenmechanisch durch Störungstheorie zweiter Ordnung [13, 14] als auch klassisch über Ratengleichungen [15] beschreiben. Beide Betrachtungsweisen führen zu einer Absorptionswahrscheinlichkeit proportional zum Quadrat der eingestrahlten Intensität [14]. Für Photonen mit der gleichen Frequenz ν beträgt die Anzahl an absorbierten Photonen in einem Material pro Zeiteinheit

$$\frac{dn_p}{dt} = \frac{\sigma_2^a N}{(h\nu)^2} I^2, \quad (2.1)$$

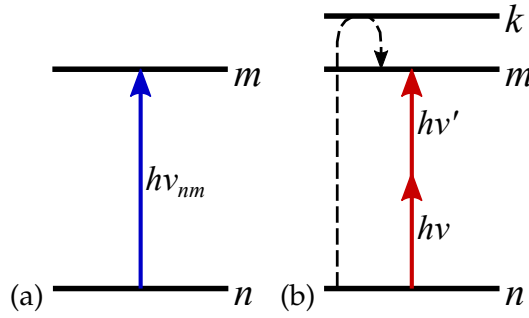


Abbildung 2.1: (a) Anregung eines Atoms durch ein absorbiertes Photon und (b) Anregung eines Atoms durch zwei absorbierte Photonen.

wobei σ_2^a der Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitt der Zwei-Photonen-Absorption, N die Dichte an absorbierenden Molekülen und I die Strahlungsintensität ist.

Alternativ kann die Absorption eines Lichtstrahls in einem Material auch als Wechselwirkung eines Feldes mit einem Medium angesehen werden. Daraus ergibt sich für die nichtlineare Zwei-Photonen-Absorption eine absorbierte Energie pro Zeiteinheit von

$$\frac{dW}{dt} = \frac{8\pi^2\nu}{(nc)^2} I^2 \text{Im}(\chi^{(3)}) \quad (2.2)$$

mit dem Realteil des Brechungsindex des Materials n und der elektrischen Suszeptibilität dritter Ordnung $\chi^{(3)}$. Ein Zusammenhang zwischen dem Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitt aus Gleichung 2.1 und der Suszeptibilität dritter Ordnung aus Gleichung 2.2 lässt sich durch die Beziehung $dW/dt = (dn_p/dt)h\nu$ herstellen. [16]

Zur experimentellen Bestimmung des Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitts eines Materials wird üblicherweise die Änderung der Intensität eines in das Material eingestrahlt Lichtstrahls betrachtet. Der Intensitätsverlust eines Lichtstrahls, welcher durch ein absorbierendes Material propagiert, kann für eine Zwei-Photonen-Absorption durch

$$\frac{\partial I}{\partial z} = -\alpha I - \beta I^2 \quad (2.3)$$

beschrieben werden, wobei α der lineare Absorptionskoeffizient und $\beta = (\sigma_2^a N)/(h\nu)$ der Absorptionskoeffizient der Zwei-Photonen-Absorption ist. Da der Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitt der meisten Materialien sehr klein ist, sind sehr hohe Strahlungsintensitäten und eine vernachlässigbare lineare Absorption ($\alpha \sim 0$) zur Beobachtung der Zwei-Photonen-Absorption erforderlich. [17]

2.2 ZWEI-PHOTONEN-POLYMERISATION

Damit ein Material nach einer Zwei-Photonen-Absorption von Licht polymerisiert, sind zwei Faktoren von besonderer Bedeutung. Zum einen muss die in das Material eingebrachte Strahlungsintensität ausreichend hoch sein um eine photochemische Reaktion auszulösen, zum anderen muss das Material in der Lage sein durch eine photochemische Reaktion zu polymerisieren. Beide Aspekte werden im Folgenden erörtert. Darüber hinaus wird eine Übersicht über für Zwei-Photonen-Polymerisation eingesetzte Materialien gegeben.

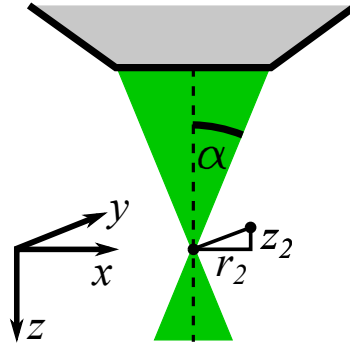


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des durch ein Objektiv fokussierten Lichtstrahls und des verwendeten Koordinatensystems.

2.2.1 Intensitätsverteilung im Bereich des Fokus

Aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit für eine Zwei-Photonen-Absorption findet eine solche Zwei-Photonen-Polymerisation nur in einem Bereich des Lichtstrahls mit ausreichend hoher Intensität statt, in dem genügend Photonen absorbiert werden um eine fotochemische Reaktion hervorzurufen. Eine entsprechende Strahlungsintensität wird in der Regel nur im dreidimensionalen Bereich des Fokus eines Ultrakurzpuls-lasers erzielt, in dem ein definiertes Volumen, ein sogenannter Voxel, polymerisiert. Für eine genaue Beschreibung, wie die Intensitätsverteilung in diesem Bereich bei Verwendung eines Objektivs mit hoher numerischen Apertur (NA) aussieht, eignet sich das Debye-Integral [18].

Debye-Integral

Das Lichtfeld in der Nähe des Fokus kann für ein Objektiv mit runden, rotationssymmetrischen Linsen und einer hohen NA durch das Debye-Integral beschrieben werden. Es ergibt sich damit an einem Punkt mit einem Abstand r_2 in der x-y-Ebene senkrecht zur optischen Achse und einem Abstand z_2 entlang der optischen Achse vom Fokus (siehe Abbildung 2.2) das Feld [18]:

$$U(v, u) = \frac{2\pi i}{\lambda} \exp(-ikz_2) \int_0^\alpha P(\theta) \mathcal{J}_0\left(\frac{v \sin \theta}{\sin \alpha}\right) \exp\left(\frac{i u \sin^2(\theta/2)}{2 \sin^2(\alpha/2)}\right) \sin \theta d\theta, \quad (2.4)$$

wobei

$$v = kr_2 \sin \alpha \quad \text{und} \quad u = 4kz_2 \sin^2(\alpha/2). \quad (2.5)$$

Des Weiteren ist $\mathcal{J}_0(x)$ eine Bessel-Funktion erster Gattung der 0. Ordnung, α der Konvergenzwinkel, der sich aus der NA bestimmen lässt, und $P(\theta)$ die Apodisationsfunktion für eine Linse. Für kommerzielle Objektive gilt in der Regel

$$P(\theta) = P(r) \sqrt{\cos \theta}, \quad (2.6)$$

wobei $P(r)$ die Lichtfeldverteilung über die Linsenapertur (Pupillenfunktion) ist. [18]

Für Objektive mit hoher NA lässt sich die Intensitätsverteilung im Bereich des Fokus aus dem Betragsquadrat von Gleichung 2.4 berechnen. Allerdings ist für eine

Untersuchung der Depolarisation eine vektorielle Betrachtung des elektromagnetischen Feldes nötig. Wenn die NA und somit der maximale Konvergenzwinkel α klein ist, kann das Feld zudem durch die paraxiale Näherung

$$\sin \theta \approx \theta \quad (2.7)$$

vereinfacht werden.

Paraxiale Näherung

Durch die paraxiale Näherung ergibt sich für Objektive mit einer kleinen NA folgende Intensitätsverteilung im Bereich des Fokus [19]:

$$I(v^*, u^*) = \left(\frac{2}{u^*}\right)^2 [\mathcal{U}_1^2(v^*, u^*) + \mathcal{U}_2^2(v^*, u^*)] I_0 \quad \text{für } |u^*/v^*| < 1 \quad (2.8)$$

und

$$I(v^*, u^*) = \left(\frac{2}{u^*}\right)^2 \left\{ 1 + \mathcal{V}_0^2(v^*, u^*) + \mathcal{V}_1^2(v^*, u^*) - 2\mathcal{V}_0(v^*, u^*) \cos \left[\frac{1}{2} \left(u^* + \frac{v^{*2}}{u^*} \right) \right] - 2\mathcal{V}_1(v^*, u^*) \sin \left[\frac{1}{2} \left(u^* + \frac{v^{*2}}{u^*} \right) \right] \right\} I_0 \quad (2.9)$$

für $|u^*/v^*| > 1$

Dabei sind

$$v^* = \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{a}{f}\right) r_2 \quad \text{und} \quad u^* = \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{a}{f}\right)^2 z_2 \quad (2.10)$$

dimensionslose Variablen, $\mathcal{U}_n(v^*, u^*)$ und $\mathcal{V}_n(v^*, u^*)$ Lommel Funktionen, a der Radius der Linsenapertur, I_0 die Intensität im Fokus, f die Brennweite, r_2 der Abstand in der Fokusebene senkrecht zur optischen Achse und z_2 der Abstand entlang der optischen Achse vom Fokus. Für die Intensitätsverteilung in der Fokusebene senkrecht zur optischen Achse und für die Intensitätsverteilung entlang der optischen Achse reduzieren sich die Gleichungen 2.8 und 2.9 auf

$$I(v^*, 0) = \left[\frac{2\mathcal{J}_1(v^*)}{v^*} \right]^2 I_0 \quad (2.11)$$

und

$$I(0, u^*) = \left[\frac{\sin(u^*/4)}{u^*/4} \right]^2 I_0. \quad (2.12)$$

In Abbildung 2.3 werden mit dem Debye-Integral berechnete Intensitätsverteilungen in der Fokusebene und entlang der optischen Achse für eine NA von 0,5 und 0,75 und eine Wellenlänge von 515 nm mit und ohne paraxiale Näherung veranschaulicht. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die paraxiale Näherung für höhere numerische Aperturen nicht eignet.

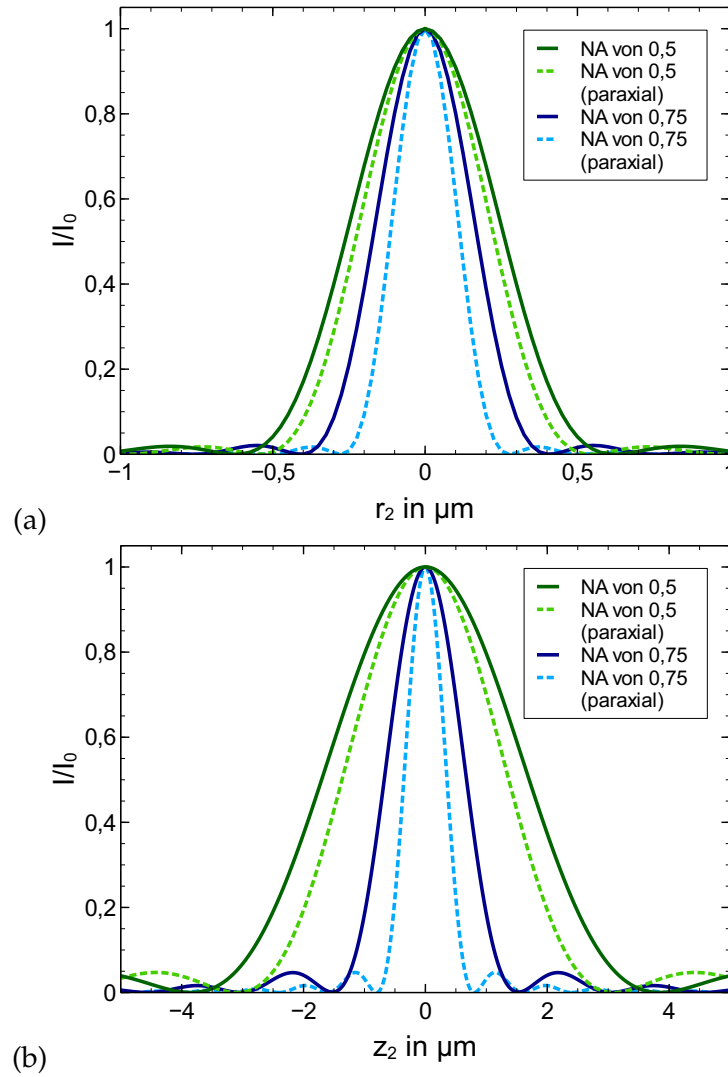


Abbildung 2.3: Intensitätsverteilungen (a) in der Fokusebene und (b) entlang der optischen Achse für eine NA von 0,5 und 0,75 bei einer Wellenlänge von 515 nm mit und ohne paraxiale Näherung.

Vektoriellcs Debye-Integral

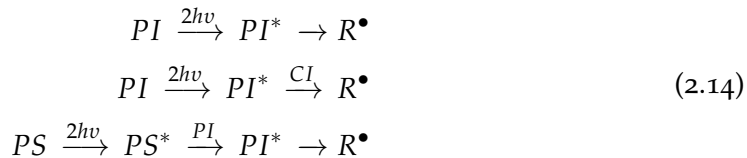
Die vektorielle Betrachtung des elektromagnetischen Feldes für ein Objektiv mit runden, rotationssymmetrischen Linsen ergibt sich aus dem vektoriellen Debye-Integral. An einem Punkt mit einem Abstand r_2 und einem Winkel ψ in der x-y-Ebene senkrecht zur optischen Achse und einem Abstand z_2 entlang der optischen Achse vom Fokus kann das Feld durch [18, 20]

$$\mathbf{E}(r_2, \psi, z_2) = \frac{i}{\lambda} \iint_{\Omega} \mathbf{E}_0(\theta, \varphi) \exp[-ikr_2 \sin \theta \cos(\varphi - \psi) - ikz_2 \cos \theta] \sin \theta d\theta d\varphi \quad (2.13)$$

mit der vektoriellen Verteilung des einfallenden elektrischen Feldes $\mathbf{E}_0(\theta, \varphi)$ einschließlich der Amplitude, Phase und Polarisation beschrieben werden. Diese Gleichung wird für die theoretischen Berechnungen in Abschnitt 4.3.3 verwendet, um die Wirkung einer hohen NA und der Polarisation auf die Intensitätsverteilung im Bereich des Fokus zu zeigen. Eine gezielte Modifikation der Intensitätsverteilung bietet die Möglichkeit das durch Belichtung polymerisierte Volumen optimal auf spezifische Anwendungen anzupassen [21, 22].

2.2.2 Fotochemische Reaktion

Zur Zwei-Photonen-Polymerisation eines Materials kommt es, wenn sich durch die Absorption von Licht aus den Monomeren und/oder Oligomeren einer Flüssigkeit feste Polymere bilden. Die fotochemische Reaktion wird typischerweise dadurch gestartet, dass durch eingestrahktes Laserlicht im Material freie Radikale oder kationische Radikale generiert werden. Dazu wird ein Photosensibilisator *PS* oder direkt ein Photoinitiator *PI* durch Zwei-Photonen-Absorption angeregt. Dieser erzeugt entweder selbst oder durch Reaktion mit einem Co-Initiator *CI* Radikale R^\bullet . Die möglichen Reaktionswege sind:



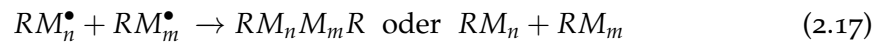
In einem nächsten Schritt reagieren die Radikale mit den Monomeren *M*.



Die entstandenen Monomerradikale RM^\bullet verbinden sich mit weiteren Monomeren zu größeren Monomerradikalen und verlängern damit die Polymerkette.



Dieser Prozess endet, sobald zwei Monomerradikale aufeinandertreffen und entweder eine gemeinsame oder zwei Polymerketten bilden. [23–25]



Die Polymerisation eines Photopolymers findet jedoch erst statt, wenn die Dichte an Radikalen im Material eine minimale Konzentration (Konzentrationschwellwert) überschreitet. Das wird dadurch erreicht, dass die Intensität des eingebrachten

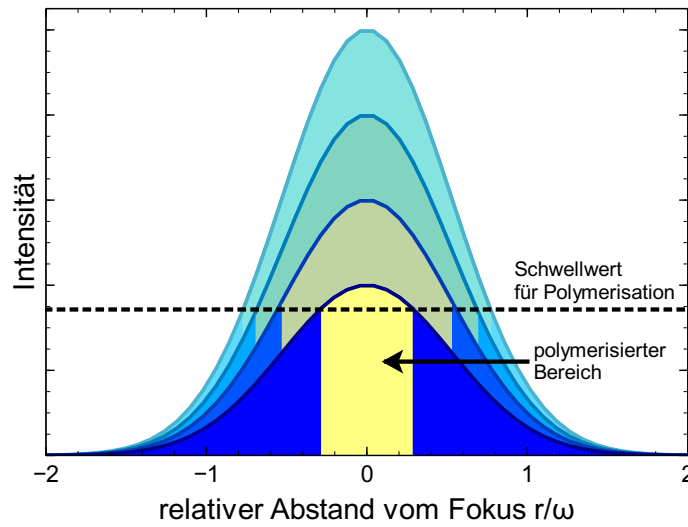


Abbildung 2.4: Schwellwertverhalten der Zwei-Photonen-Polymerisation für unterschiedliche hohe Intensitäten des in das Material eingestrahlt Lichts.

Licht groß genug ist (Belichtungsschwellwert) um durch Zwei-Photonen-Absorption genügend Radikale zu generieren. Die Strahlungsintensität, welche hierfür benötigt wird, ist bei einer Zwei-Photonen-Absorption im Vergleich zur linearen Absorption von einem Photon wesentlich größer, in einer Größenordnung von TW/cm^2 , da der Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitt mehrere Größenordnungen kleiner ist. Deshalb werden meistens Ultrakurzpuls laser und Objektive mit hoher NA eingesetzt um im Bereich des Fokus den Belichtungsschwellwert der Zwei-Photonen-Polymerisation zu erreichen. [26]

Aufgrund dieses Schwellwertverhaltens kann bei der Zwei-Photonen-Polymerisation durch kontrolliertes Anpassen der Laserparameter leicht oberhalb des Schwellwerts für Polymerisation eine Auflösung unterhalb des Beugungslimits erreicht werden. In Abbildung 2.4 ist das Schwellwertverhalten für eine Gaußsche Intensitätsverteilung des in das Material eingestrahlt Lichts mit einem Strahlradius ω veranschaulicht. Die Größe des polymerisierten Volumens kann mit Hilfe des Konzentrationsschwellwerts der Radikale im Photopolymer und des Belichtungsschwellwertes abgeschätzt werden. Dafür wird angenommen, dass die Dichte an Radikalen ρ_R , welche durch Belichtung mit einem Ultrakurzpuls laser erzeugt wird, durch eine einfache Ratengleichung ermittelt werden kann [25, 27]:

$$\frac{\partial \rho_R}{\partial t} = \frac{\sigma_2 (\rho_{PI} - \rho_R)}{(h\nu)^2} I^2, \quad (2.18)$$

wobei σ_2 der effektive Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitt für die Entstehung von Radikalen, $I = I(r, z, t)$ die Strahlungsintensität und ρ_{PI} die anfängliche Dichte an Photoinitiatoren ist. Der effektive Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitt $\sigma_2 = \sigma_2^a \eta$ ergibt sich aus dem Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitt der Zwei-Photonen-Absorption σ_2^a und einem Wirkungsgrad η , mit dem durch die Absorption ein Radikal generiert wird. Dieser Wirkungsgrad hängt von mehreren Faktoren ab. Der Photoinitiator kann

reaktionslos zurück in den Grundzustand zerfallen oder durch Quenching kann, unter anderem in Verbindung mit Sauerstoff, die Erzeugung von Radikalen reduziert werden [23, 28].

Durch Lösen der Ratengleichung und genaue Angaben zur Intensitätsverteilung im Bereich des Fokus kann eine Aussage zur Größe des polymerisierten Volumens im Material getroffen werden. Dabei wird meistens eine Gaußsche Intensitätsverteilung angenommen und nicht die in Abschnitt 2.2.1 eingeführten exakteren Debye-Integrale. Ein Überblick über bereits für Zwei-Photonen-Polymerisation verwendete fotoempfindliche Materialien wird im nächsten Abschnitt gegeben.

2.2.3 Fotoempfindliche Materialien

Die photochemische Reaktion in Abschnitt 2.2.2 zeigt, dass ein für Zwei-Photonen-Polymerisation geeignetes Material häufig mindestens zwei Komponenten enthält, Monomere oder eine Kombination aus Monomeren und Oligomeren, welche sich zu Polymeren verketteten, und einen Photoinitiator, welcher das eingestrahlte Laserlicht absorbiert und die Polymerisation startet. Bei der Wahl der Komponenten sind verglichen mit der linearen Absorption von Licht weitere Bedingungen zu berücksichtigen.

Das Material mit Monomeren, Oligomeren und Photoinitiator ist bei der Wellenlänge des eingestrahlichten Lichts transparent und der Laserstrahl wird primär im Bereich des Fokus und nicht beim Eindringen in das Material absorbiert. Außerdem sollten die Monomere/Oligomere bei Photonen mit der halben Wellenlänge von den Photonen für Zwei-Photonen-Absorption transparent sein um Verbrennungen oder Ablation des Materials zu vermeiden. Für den Photoinitiator reicht es nicht aus, dass er die eingestrahlichten Photonen durch Zwei-Photonen-Absorption absorbiert. Er sollte einen hohen Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitt aufweisen, einen hohen Wirkungsgrad zwischen Zwei-Photonen-Absorption und der Erzeugung von Radikalen haben und hoch reaktive Radikale generieren. [29]

Photoinitiatoren

Es gibt eine Vielzahl von Photoinitiatoren, die heutzutage für eine Zwei-Photonen-Polymerisation eingesetzt werden. Zunächst wurden aufgrund ihrer Verfügbarkeit gängige Photoinitiatoren, die für lineare Absorption konzipiert waren, eingesetzt. Die meisten davon (unter anderem die Irgacure Serien 184, 261, 369, 651, 754, 819, 907 und Darocure Serien TPO, MBF, 1173 [30]) besitzen einen kleinen Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitt, so dass hohe Laserleistungen und Belichtungszeiten nötig sind. Dadurch kann es leichter zu Beschädigungen im polymerisierten Material kommen und die Schreibgeschwindigkeit bei der Anfertigung von Strukturen wird stark limitiert. Zudem hängt die Auflösung der Zwei-Photonen-Polymerisation hauptsächlich von der Laserleistung und Belichtungszeit ab, wobei kleinere Laserleistungen und kürzere Belichtungszeiten zu einer höheren Auflösung führen. [31, 32]

Das Augenmerk bei der Herstellung von Photoinitiatoren speziell für Zwei-Photonen-Polymerisation lag anfangs auf der Anhebung des Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitts. Die erwartete Effizienzsteigerung blieb jedoch oft aus, da der Wirkungsgrad zwischen Zwei-Photonen-Absorption und der Erzeugung von Radikalen und die Reaktivität der Radikale zu klein war. Ein effizienter Photoinitiator zeichnet sich

dadurch aus, dass er einen hohen Wirkungsgrad zur Generierung von reaktiven Radikalen hat, thermisch und in der Dunkelheit stabil ist und sich gut in den restlichen Materialkomponenten lösen lässt. Die Polymerisation wird dabei mit Ausnahme von SU-8 normalerweise durch freie Radikale gestartet. [29, 31]

Mit passenden Initiatoren zum Starten der fotochemischen Reaktion lassen sich Auflösungen unter 100 nm für Zwei-Photonen-Polymerisation erreichen. In Haske et al. [33] wurden durch den Einsatz des Chromophors 4,4'-bis(di-n-butylamino)biphenyl Strukturen mit einer lateralen Linienbreite von (65 ± 5) nm erstellt. Durch einen zusätzlichen Lichtstrahl zur Unterdrückung des Prozesses der Zwei-Photonen-Polymerisation erzielten Gan et al. [34] mit dem Initiator 2,5-bis(p-dimethylaminocinnamylidene)-cyclopentanon (BDCC) sogar Linien mit einer lateralen Linienbreite von 9 nm mit 52 nm Auflösung zwischen zwei Linien. Durch optimierte Photoinitiatoren lassen sich überdies abhängig vom Initiator Schreibgeschwindigkeiten von 80 mm/s [31] und sogar 1000 mm/s [35] realisieren. Neben der Optimierung hin zu höheren Auflösungen und schnelleren Schreibgeschwindigkeiten bekommt die Biokompatibilität der Materialien für biologische und medizinischen Anwendungen eine immer größere Bedeutung [36].

Acrylat-Materialien

Meistens werden für die Zwei-Photonen-Polymerisation lichthärtende Acrylat-Materialien, Epoxid-Materialien oder organisch-anorganische Hybridmaterialien verwendet, da sie kommerziell erhältlich sind und für die Anwendung relevante Eigenschaften aufweisen. Bereits bei der ersten mittels Zwei-Photonen-Polymerisation hergestellten Struktur wurde ein auf Acrylat basierendes Photopolymer (SCR-500) benutzt [37]. Lichthärtende Acrylat-Materialien sind aufgrund ihrer Transparenz im nahen Infrarotbereich und sichtbaren Bereich meistens auch bei einer Wellenlänge von 515 nm anwendbar. Sie polymerisieren schnell und während der Aushärtung entstehen inhomogene Polymernetzwerke. Die generierten Strukturen zeigen Schrumpfung aufgrund der Volumenkontraktion während der Polymerisation und sind chemisch und mechanisch stabil. [29, 38]

Lichthärtende Acrylat-Materialien sind für biologische und medizinische Anwendungen von Interesse. Auf mittels Zwei-Photonen-Polymerisation hergestellten Gerüststrukturen wurde bereits eine gute Adhäsion und Proliferation von Zellen festgestellt [5, 39–41]. Die in dieser Arbeit untersuchten Materialien E-Shell 600 und IP-Dip sind Vertreter der auf Acrylat basierenden Materialien.

Epoxid-Materialien

Das für Zwei-Photonen-Polymerisation am häufigsten eingesetzte Epoxid-Material ist SU-8. Bei diesem Material findet eine kationische Reaktion statt, durch die eine starke Säure generiert wird. Erst eine Hitzebehandlung nach der Belichtung führt zu Polymerisation. SU-8 ist ebenfalls im sichtbaren und nahen Infrarotbereich transparent und die polymerisierten Strukturen sind thermisch, mechanisch und chemisch stabil. Das ausgehärtete Material ist gegenüber Lösungsmitteln, Säuren und Basen beständig. Zudem ist polymerisiertes SU-8 für eine permanente Verwendung geeignet und zeigt Biokompatibilität. [29, 42–44] Für optische und mikrofluidische Anwendungen ist außerdem mr-NIL 6000 eine gute Wahl, welches bereits für die Herstellung von diffraktiven optischen Elementen durch Zwei-Photonen-Polymerisation eingesetzt wurde

[45, 46]. Neben SU-8 wird in dieser Arbeit mr-DWL als potenzielles Epoxid-Material für Zwei-Photonen-Polymerisation getestet.

Organisch-anorganische Hybridmaterialien

In einem Sol-Gel-Prozess lassen sich organisch-anorganische Hybridmaterialien wie die kommerziell erhältlichen Ormocere[®] (organically modified ceramic microresist) herstellen. Dabei wird durch eine Phasentransformation aus einer Sole aus metallischen Oxiden oder Alkoholaten (Präkursoren) ein Gel gewonnen. Die Erzeugung von makromolekularen hybriden Netzwerkstrukturen, welche durch Licht polymerisieren, beinhaltet meistens eine katalytische Hydrolyse der Sol-Gel-Präkursoren sowie die Polykondensation der durch die Hydrolyse entstandenen Produkte und anderen aktiven Komponenten im Reaktionsmedium. Durch eine Polymerisation entsteht aus dem Hybridmaterial ein festes Material, das Glas ähnlich ist. [47]

Ormocere auf Silikat-Basis besitzen ausgehärtet ähnliche Eigenschaften wie Silikatglas (chemische und thermische Stabilität, vergleichbare Härte) und lassen sich gut polymerisieren. Sie haben den Vorteil, dass sie ohne zusätzliche Vorbehandlung strukturiert werden können und einfach in der Handhabung sind. Auch bei diesen Materialien ist Schrumpfung zu beobachten. Aufgrund ihrer Biokompatibilität und chemischen Trägheit finden Ormocere bei der Herstellung von biomedizinischen Komponenten, z. B. Mikronadeln, Anwendung [11, 29, 47, 48]. Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien OrmoCore, OrmoClad und OrmoComp[®] zählen zu dieser Art von Hybridmaterialien.

Die Entwicklung von Hybridmaterialien mit mehreren metallischen Alkoholaten führte zu einer verbesserten räumlichen Auflösung und verringerten Schrumpfung. Durch Anpassen der Materialkomponenten wie Silizium, Zirkonium und Titan können die mechanischen und optischen Eigenschaften des Materials verändert werden. In der Literatur sind eine Vielzahl von Untersuchungen und Anwendungen mit dem modifizierten Hybridmaterial SZ2080 zu finden [43, 49–51].

Positiv-Photoresiste

Im Vergleich zu den bislang beschriebenen Materialien, bei welchen es zu einer Aushärtung des Materials durch Belichtung kommt, wird bei Positiv-Photoresisten festes Material wieder löslich. Diese Materialien werden hauptsächlich in der Halbleiterindustrie benutzt und bestehen meistens aus einem Novolak und einer fotosensitiven Substanz, beispielsweise Diazonaphthochinon. Zum besseren Auftragen der Materialien auf Substrate können zudem Lösungsmittel enthalten sein um die Viskosität zu verringern. Durch Belichtung mit einer geeigneten Wellenlänge startet die fotosensitive Substanz eine Reaktion im Material und die belichteten Stellen werden löslich. Das Material an diesen Stellen kann mit einem Entwickler entfernt werden, so dass an den unbelichteten Stellen eine Struktur stehen bleibt. [52]

Positiv-Photoresiste kommen aus der Belichtung mit ultravioletem (UV-) Licht. Durch Zwei-Photonen-Absorption ist es möglich auch dreidimensionale Strukturen wie innen liegende Mikrokanäle [53], Wellenleiter [1] oder dreidimensionale inverse Woodpile-Strukturen für photonische Kristalle [54] im Material zu erzeugen. Das positive Photoresist ma-P 1275 wird in Abschnitt 4.1 zusätzlich zu den Acrylat-Materialien E-Shell 600 und IP-Dip, den Epoxid-Materialien SU-8 und mr-DWL und den Hybrid-

materialien OrmoCore, OrmoClad und OrmoComp[®] betrachtet und dessen Eignung für Zwei-Photonen-Polymerisation bei einer Wellenlänge von 515 nm analysiert.

2.3 VERGLEICH MIT ANDEREN DIREKTSCHREIBTECHNIKEN

Das Laserdirektschreiben mittels Zwei-Photonen-Polymerisation, auf welches in den vorangegangenen Abschnitten ausführlich eingegangen wurde, ist nur eine von vielen Technologien um Strukturen zu generieren. Neben der Zwei-Photonen-Polymerisation gibt es weitere Techniken, die ein Direktschreiben von oder in verschiedene Materialien ermöglichen. Die folgenden Kriterien hat eine Technik zu erfüllen, damit diese dem Direktschreiben zugeordnet werden kann.

Das Direktschreiben schließt alle Techniken ein, mit denen in wenigen Prozessschritten eine Struktur durch Modifikation von einzelnen Punkten angefertigt wird. Die Struktur lässt sich auf einer zuvor definierten Stelle auf einem beliebigen Substrat generieren und kann durch punktuelle Abgabe von einem Material oder durch punktuelle Materialmodifikation erschaffen werden. Die einzelnen erzeugten Voxel werden dazu verwendet aus Linien, Schichten und dreidimensionalen Formen die gesamte Struktur zu erstellen. Beim Direktschreiben arbeiten eine Bewegungssteuerung und eine eigenständige Quelle für Material oder Energie computergesteuert zusammen um vordefinierte Objekte anzufertigen. [55]

Techniken, die zum Direktschreiben herangezogen werden können, sind in Abbildung 2.5 veranschaulicht. Die einzelnen Techniken werden im Folgenden erklärt und mit der Zwei-Photonen-Polymerisation verglichen. Zwei- oder Mehrphotonen-Prozesse wie die Zwei-Photonen-Polymerisation gehören zu den laserbasierten Direktschreibtechniken. Darüber hinaus gibt es Methoden, bei denen durch gezieltes Auftragen von Material auf ein Substrat die gewünschte Struktur generiert wird, und Techniken, bei denen Material durch einen Teilchenstrahl präzise auf das Substrat abgeschieden wird.

2.3.1 *Materialauftragende Techniken*

Die materialauftragenden Techniken zeichnen sich dadurch aus, dass die Materialien erst während der Strukturierung auf das Substrat aufgebracht werden. Beim Inkjet-Druckverfahren werden über einen Druckkopf, ähnlich wie bei einem Tintenstrahldrucker, Tropfen einer Flüssigkeit auf ein Substrat aufgetragen und anschließend ausgehärtet. Durch das Auftragen von mehreren Schichten kann hierbei auch in die Höhe gedruckt werden. Im Vergleich zu anderen Verfahren kann bei diesem mit einer hohen Schreibgeschwindigkeit und mehreren Materialien in einem Prozess gearbeitet werden. Die Auswahl der Materialien wird jedoch dadurch eingeschränkt, dass sie als Flüssigkeit über einen Druckkopf applizierbar sein müssen. [56]

Mit der elektrohydrodynamischen (EHD) Inkjet-Drucktechnologie lassen sich darüber hinaus wesentlich feinere Tropfen erzielen, da das Material nicht aus der Düse eines Druckkopfs gedrückt wird, sondern durch eine elektrostatische Kraft aus der Düse hinausgezogen wird. Dafür wird zwischen Substrat und Druckkopf eine hohe Spannung angelegt. Die Tropfen, welche aufgrund der angelegten Kraft die Oberflächenspannung

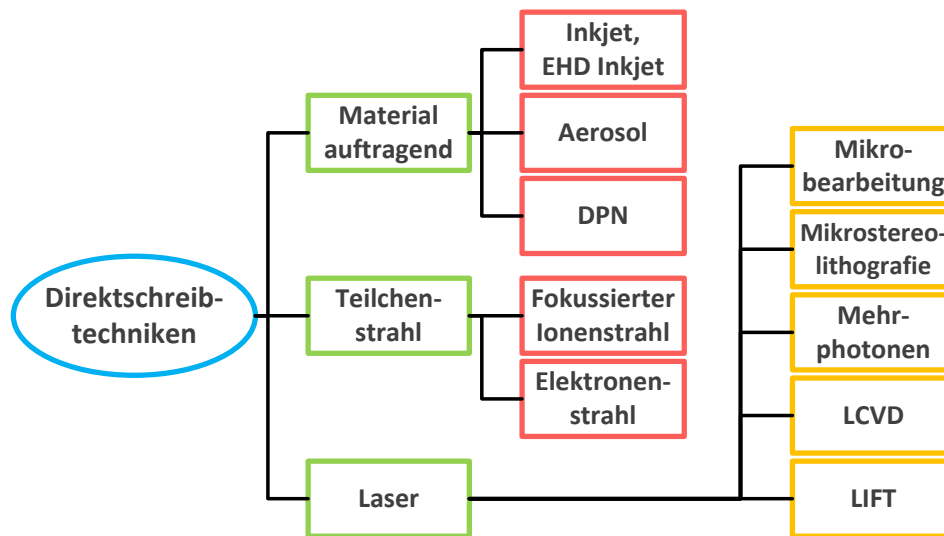


Abbildung 2.5: Blockdiagramm zur Veranschaulichung verschiedener Techniken zum Direktschreiben.

des Materials überwinden und zum Substrat gelangen sind normalerweise wesentlich kleiner als die Öffnung der Düse. Dadurch kann eine Linienbreite von unter einem Mikrometer erreicht werden. Zu den verwendeten Materialien zählen Polymere, metallische Nanopartikel, biologische Materialien und Metallschmelzen. Die Schreibgeschwindigkeit ist durch die Geschwindigkeit, mit welcher das Material die Düse verlässt, begrenzt und langsamer als bei dem zuvor vorgestellten Inkjet-Verfahren. [57]

Zum Auftragen von beliebigen Materialien eignen sich Aerosol-Druckverfahren. Das Material wird mit Hilfe eines Zerstäubers zerteilt, so dass ein Aerosol aus Mikrotropfen entsteht. Dieses wird aerodynamisch mittels eines strömenden Schutzgases durch einen die Strömung führenden Druckkopf fokussiert und damit das Material auf ein Substrat aufgetragen. Dabei ist die kinetische Energie klein genug um auch biologische Materialien ohne Schädigung der enthaltenen lebenden Zellen auftragen zu können. Die Größe der Tropfen liegt meistens in einem Bereich von 1 bis 5 μm .

Eine weitere Technik ist die Dip-Pen Nanolithografie. Hierbei wird die Spitze eines Rasterkraftmikroskops in ein Material eingetaucht um molekulare Strukturen wie Proteine, Polymere, DNA oder aktive Enzyme durch Kapillartransport auf ein Substrat zu transferieren. Die molekularen Strukturen breiten sich dann solange in einer dünnen Schicht auf dem Substrat aus, bis die Ausbreitung durch chemische Bindung der Strukturen an das Substrat beendet wird. Mit dieser Technologie lassen sich zweidimensionale Strukturen mit sub-Mikrometer Auflösung herstellen. [58]

Das Inkjet-Druckverfahren ist von den vorgestellten materialauftragenden Techniken die schnellste und es können damit schneller große dreidimensionale Strukturen hergestellt werden als mit der Zwei-Photonen-Polymerisation. Allerdings erreicht dieses Verfahren bei Weitem nicht die Auflösung der Zwei-Photonen-Polymerisation von etwa 100 nm. Mit der EHD Inkjet-Drucktechnologie und der Dip-Pen Nanolithografie sind Auflösungen im Bereich der Zwei-Photonen-Polymerisation möglich und die Schreibgeschwindigkeiten sind ähnlich. Dennoch hat die Zwei-Photonen-Polymerisation gegenüber allen materialauftragenden Technologien den Vorteil, dass

sie aufgrund der Polymerisation im Bereich des Fokus eines Laserstrahls nicht an eine Schicht für Schicht Herstellung gebunden ist und beliebige dreidimensionale Körper generiert werden können.

2.3.2 *Teilchenstrahlbasierte Techniken*

Alternativ können Strukturen mit einem Teilchenstrahl generiert werden. Der Energieeintrag eines fokussierten Ionenstrahls oder eines Elektronenstrahls kann dazu genutzt werden mit einem Prozessgas, welches über das Substrat gesprüht wird, zu wechselwirken. Die Aufspaltung eines im Prozessgas enthaltenen organischen Moleküls mit dem gewünschten Element führt dazu, dass dieses Element aus dem Gas auf das Substrat abgeschieden wird. Eine Abscheidung aus dem Prozessgas findet nur an den Stellen statt, an denen der Teilchenstrahl einwirkt und ermöglicht eine präzise Abscheidung von Material auf das Substrat. [58]

Hauptsächlich werden mit dieser Technologie Metalle auf Substrate aufgebracht und Linienbreiten im Bereich von 50 nm erzielt. Eine Linienbreite in dieser Größenordnung kann mit Zwei-Photonen-Polymerisation bei der Anfertigung einzelner Linien ebenfalls erreicht werden. Der sicherlich größte Nachteil der teilchenstrahlbasierten Technik ist die sehr langsame Schreibgeschwindigkeit von 10 bis 50 $\mu\text{m/s}$ und die damit verbundenen langen Fertigungsdauern. [33, 34, 55]

2.3.3 *Laserbasierte Techniken*

Es gibt eine Vielzahl von laserbasierten Techniken, die den Kriterien des Direktschreibens entsprechen. Diese lassen sich in materialabtragende, materialmodifizierende und materialauftragende Methoden unterteilen. Der Einsatz eines Lasers für diese unterschiedlichen Prozesse ist möglich, da Parameter wie Laserleistung, Wellenlänge, Repetitionsrate und Pulslänge bei Laserpulsen, Belichtungszeit und Größe des auf das Material gerichteten Lichtstrahls optimal auf einen Prozess angepasst werden können.

Die Lasermikromaterialbearbeitung wurde als erste dieser Techniken realisiert und wird zum Bohren, Schneiden, Markieren und Gravieren von unterschiedlichen Materialien eingesetzt. Damit ist es eine abtragende Technik, bei welcher der eingebrachte Laserstrahl zu einer Ablation von Material führt. Eine Veränderung der Eigenschaften von Materialien ist darüber hinaus zu erzielen, wenn die Laserintensität unterhalb der Intensität für eine Ablation bleibt. Dieser Intensitätsbereich wird bei der Mikrostereolithografie und Mehrphotonenabsorption genutzt um ein fotosensitives Material zu modifizieren.

Bei der Mikrostereolithografie wird ein flüssiger fotosensitiver Lack durch Einwirken eines Lichtstrahls in einem wohldefinierten Bereich in einer dünnen Materialschicht polymerisiert. Durch das Aushärten von mehreren übereinander liegenden Schichten können dreidimensionale Objekte hergestellt werden. Für die Belichtung einer Schicht kann jeder der zu polymerisierenden Punkte der Schicht mit einem fokussierten Laser abgefahren werden oder alle zu polymerisierenden Punkte der Schicht gleichzeitig durch die Projektion eines Bildes belichtet werden. Bei beiden Methoden wird der Lack an der Materialoberfläche strukturiert und anschließend die Schicht senkrecht zur Materialoberfläche verfahren um eine weitere Schicht an der Oberfläche zu struk-

turieren. Alternativ kann das Licht ähnlich der Zwei-Photonen-Polymerisation in das Material fokussiert werden um eine Polymerisation im Material hervorzurufen. Die Voraussetzungen hierfür sind, dass das eingebrachte Licht vom Material nur schwach absorbiert wird und das Material ein nichtlineares Verhalten aufweist, mit welchem eine Polymerisation bei kleinen Lichtleistungen verhindert wird. Mit dieser dritten Methode können sogar Linien mit einer Breite unter $1\text{ }\mu\text{m}$ erzeugt werden. [55, 59]

Unter die additiven laserbasierten Techniken fallen die laserinduzierte chemische Gasphasenabscheidung (LCVD) und das Laser Induced Forward Transfer (LIFT)-Verfahren. Die LCVD basiert auf einem ähnlichen Prinzip wie die im vorherigen Abschnitt vorgestellte teilchenstrahlbasierte Technik. Die Strukturierung eines Substrats findet in einer mit Prozessgas gefüllten Vakuumkammer statt. Das Prozessgas enthält dabei organische Moleküle mit dem gewünschten Element, welches auf das Substrat abgeschieden werden soll. Durch Abfahren der zu beschichtenden Stellen auf dem Substrat mit einer Geschwindigkeit von $0,5$ bis 5 mm/s werden die bestrahlten Stellen erhitzt. Durch den Hitzeeintrag spalten sich in diesem Bereich die Moleküle und das gewünschte Element wird auf das Substrat abgeschieden. Durch wiederholtes Abfahren ist auch ein schichtweises Aufbringen des Materials realisierbar. Die Schreibgeschwindigkeiten sind dabei höher als bei der teilchenstrahlbasierten Technik, jedoch entspricht die typische Linienbreite dem zwei- bis dreifachen des Laserstrahldurchmessers und ist somit größer als bei der teilchenstrahlbasierten Technik oder Zwei-Photonen-Polymerisation.

Beim LIFT-Verfahren wird das Material, welches auf ein Substrat aufgetragen werden soll, zunächst als dünne Schicht auf ein optisch transparentes Trägermaterial aufgebracht. Die Schicht wird anschließend parallel und mit einem Abstand von 25 bis $100\text{ }\mu\text{m}$ zum darunter liegenden Substrat ausgerichtet. Durch die Bestrahlung mit einem Laserstrahl wird das Material von der dünnen Schicht selektiv auf das Substrat übertragen. Dieses Verfahren wurde zum Transfer von Metallen und Oxiden entwickelt. Überdies wurde gezeigt, dass Biomaterialien mittels einer zusätzlichen Schicht eines optisch absorbierenden Materials von einem Trägermaterial auf ein Substrat überführt werden können. Eine hohe Schreibgeschwindigkeit (bis 1000 mm/s) und eine gute Auflösung sind die Vorteile dieser Methode. [55, 58]

Im Vergleich zu den anderen laserbasierten Techniken hat die Zwei-Photonen-Polymerisation aufgrund der Polymerisation im Bereich des Fokus eines Laserstrahls die höchste Flexibilität und die größte Genauigkeit bei der Anfertigung von dreidimensionalen Körpern. Die für die Zwei-Photonen-Polymerisation geeigneten Materialien sind begrenzt und decken kein so breites Spektrum an Materialien ab wie bei dem LIFT-Verfahren oder der Lasermikromaterialbearbeitung. Dennoch zeichnen sich viele der Materialien für Zwei-Photonen-Polymerisation durch Biokompatibilität, chemische Beständigkeit und mechanische Stabilität aus, so dass die Zwei-Photonen-Polymerisation für eine Vielzahl von Anwendungsgebieten von Interesse ist. [58]

2.4 ANWENDUNGSGEBIETE

Das Laserdirektschreiben mittels Zwei-Photonen-Polymerisation eignet sich zur Herstellung von beliebigen dreidimensionalen Objekten mit einer hohen Auflösung. Aufgrund der gezielten punktuellen Aushärtung im Material und der damit verbundenen hohen Prozessdauer für makroskopische Objekte wird die Zwei-Photonen-Polymerisation aktuell vor allem zur Anfertigung von mikrooptischen, medizintechnischen, mikroflui-

dischen und für die Messtechnik relevante Bauteilen eingesetzt. Im Folgenden wird ein Überblick über einzelne Anwendungen in diesen Bereichen gegeben und damit die vielseitigen Anwendungsgebiete dieses Herstellungsverfahrens demonstriert.

2.4.1 *Photonik*

Durch Zwei-Photonen-Polymerisation lassen sich unterschiedliche Linsenformen, Gitter und Prismen auf Glasträgern oder Faserenden von optischen Fasern aufbringen. Dabei können auch mehrere optische Funktionen kombiniert werden um z. B. in einem Herstellungsschritt Mikrolinsen mit integrierten Phasengittern zu erzeugen. Bei massiven Komponenten besteht überdies die Möglichkeit nur die äußere Hülle mittels Zwei-Photonen-Polymerisation zu generieren und den Kern in einem anschließenden Belichtungsschritt mit UV-Licht auszuhärten. [3]

Aufgrund der hohen Auflösung der durch Zwei-Photonen-Polymerisation geschaffenen Strukturen und des, im Vergleich zu anderen Methoden, einfachen Herstellungsprozesses bietet sich die Zwei-Photonen-Polymerisation zudem zur Anfertigung von dreidimensionalen photonischen Kristallen an. Neben Woodpile-Strukturen mit parallel zueinander verlaufenden Stäben, die wie Holzstapel von Ebene zu Ebene um 90° versetzt gestapelt werden, lassen sich auch komplexere Gyroid-Strukturen anfertigen, welche den photonischen Nanostrukturen auf Schmetterlingsflügeln nachempfunden sind. [60, 61]

Des Weiteren ist die Herstellung und Untersuchung von diffraktiven und dielektrischen optischen Elemente zur Strahlmodulation, selbstwachsenden Fasern in einer mit OrmoComp® gefüllten Glasküvette und Wellenleitern zur Schaffung optischer Verbindungen in gedruckten Platinen erwähnenswert [62–66]. Bei den aufgezeigten mikrooptischen Komponenten hat das verwendete Material bestimmten Anforderungen zu genügen. Meistens ist es wichtig, dass die Bauteile aus einem optisch transparenten Material sind und sich während ihres Gebrauchs durch das eingestrahlte Licht nicht verändern.

2.4.2 *Messtechnik*

Eine Eigenschaft, die bei angefertigten Mikrostrukturen aus verschiedenen Materialien zu beobachten ist, ist ein Anschwellen oder Schrumpfen der Strukturen, wenn diese von Flüssigkeiten wie Ethanol, Wasser oder Methylisobutylketon umgeben werden. Anhand des Grads der Deformation von diffraktiven optischen Elementen, mikromechanischen Sensoren oder hybriden Strukturen aus zwei unterschiedlichen Materialien lassen sich Rückschlüsse auf das die Struktur umgebende Material ziehen und Umgebungssensoren realisieren. [67]

Die gezielte Modifikation von Materialien ermöglicht darüber hinaus die Anfertigung von Biosensoren mittels Zwei-Photonen-Polymerisation. Durch die Kombination des fotosensitiven Materials TSR 820 mit Glucoseoxidase, Ferrocen, nichtionischem Tensid Triton X-100 und Kohlenstoff-Nanoröhren wurde ein Material für die Zwei-Photonen-Polymerisation geschaffen, welches gegenüber Glukose sensitiv ist. Eine aus diesem Material hergestellte Elektrode wurde in einem elektrochemischen Glukose-

sensor mit drei Elektroden auf einer Platinelektrode platziert und zur Messung der Glukosekonzentration in einer strömender Glukoselösung eingesetzt. [68]

Eine weitere Anwendung in der Messtechnik ist die Erzeugung von Nadeln auf Blattfedern von Rasterkraftmikroskopen. Durch das Laserdirektschreiben können mechanisch stabile und auf die Messaufgabe angepasste Nadeln generiert werden. Zudem lässt sich mit zusätzlich an der Blattfeder angebrachten Gitterträgern die Frequenz der Blattfeder anpassen. Für eine Vereinigung der Rasterkraftmikroskopie mit anderen mikroskopischen Methoden ist es sogar denkbar die komplette Blattfeder einschließlich Nadel mit Zwei-Photonen-Polymerisation herzustellen. [69]

2.4.3 *Mikrofluidik*

Durch Zwei-Photonen-Polymerisation können außerdem mikrofluidische Systeme mit integrierten funktionalen Komponenten geschaffen werden. Zur Messung der Durchflussrate wurde beispielsweise ein Durchflussmesser in einem Mikrokanal platziert. Durch die Strömung der durch den Kanal fließenden Flüssigkeit wird der Zeiger des Durchflussmessers ausgelenkt. Die Auslenkung wird dabei durch die Gegenkraft einer Feder begrenzt, so dass die Abhängigkeit zwischen der Durchflussrate und dem Auslenkwinkel des Zeigers zum Messen der Durchflussrate herangezogen werden kann. [70] Die Strömungsrichtung lässt sich überdies durch in ein mikrofluidisches System mittels Laserdirektschreiben eingebrachte Ventile kontrollieren [71, 72].

Für viele Anwendungen ist es auch relevant innerhalb eines fluidischen Systems Stoffe voneinander trennen zu können. Eine Möglichkeit hierfür ist die Integration von geeigneten Filtern. Durch einen in einer Kreuzung zwischen zwei Kanälen positionierten Filter war es möglich 3 μm große Polystyrolkugeln einer Suspension davon abzuhalten in den Kanal hinter dem Filter zu gelangen, wohingegen die enthaltene Rhodamin 6G Lösung den Filter passierte. Vorläufige Untersuchungen deuten zudem an, dass sich ein solcher Filter auch für die Separation von Blutplasma aus Vollblut eignen könnte. [73] Der Einsatz von Filtern ist außerdem für das Zählen und Sortieren von Zellen unterschiedlicher Größe interessant [74].

2.4.4 *Medizintechnik*

Bereits zwei der unter Mikrofluidik (siehe Abschnitt 2.4.3) genannten Komponenten sind für medizintechnische Anwendungen relevant. Zum einen sind dies Filter um Plasma oder Zellen zu separieren und zum anderen Mikroventile. Bei diesen ist neben dem Einsatz in mikrofluidischen Systemen auch ein komplexes medizinisches Implantat als Ersatz für eine Venenklappe vorstellbar [72]. Ein Implantat des Mittelohrknochens wurde schon mittels Zwei-Photonen-Polymerisation hergestellt und unbeschadet an der richtigen Stelle in einem gefrorenen menschlichen Kopf platziert und wieder entfernt [75]. Für die Akzeptanz eines Implantats im menschlichen Körper ist die Interaktion zwischen Implantatoberfläche und umgebendem Gewebe entscheidend [35, 76]. Daraus resultiert eine weitere Anwendung der Zwei-Photonen-Polymerisation, nämlich die Anfertigung von geeigneten feinen Strukturen für die Interaktion mit Gewebe oder sogar für die Gewebezüchtung.

Die Herstellung von Gerüststrukturen mittels Zwei-Photonen-Polymerisation zur Gewebezüchtung und deren Untersuchung mit Zellen wurde bislang von mehreren Gruppen durchgeführt [10, 77–79]. Dabei konnte ein erfolgreiches Wachstum von Zellen und zum Teil auch eine Ausrichtung der Zellen entlang der Strukturen gezeigt werden [9, 80]. Meistens wurden allerdings aufgrund der langen Herstellungszeiten nur sehr kleine Strukturen mit einer Abmessung weit unter einem Millimeter betrachtet. Da für Proof-of-Principle-Studien zu zellularem Verhalten jedoch mindestens eine Strukturgröße im Bereich von 1 mm^2 notwendig ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Single-line single-pass Schreibtechnik eingeführt, welche die Herstellungszeit von Gerüststrukturen stark reduziert und die Erstellung von Strukturen mit einer Oberfläche von mehr als 9 mm^2 in wenigen Minuten ermöglicht. Eine ausführliche Beschreibung der Single-line single-pass Schreibtechnik, der hergestellten Strukturen und den Zellstudien mit humanen Fibroblasten mit Bezug auf den aktuellen Stand der Technik wird in Kapitel 5 gegeben.

Neben den zuvor genannten Anwendungen lassen sich mittels Zwei-Photonen-Polymerisation Mikronadeln erzeugen, welche das Potenzial haben in weiten Bereichen die heutzutage für die Medikamentengabe oder Flüssigkeitsentnahme oftmals verwendeten Injektionsnadeln zu ersetzen [81]. Die Zwei-Photonen-Polymerisation hat gegenüber anderen Methoden zur Herstellung von Mikronadeln den Vorteil, dass sich auch komplexere dreidimensionale Nadelformen, die ein leichteres Eindringen in die Haut ermöglichen sollen, verwirklichen lassen [7, 82]. Eine Herausforderung ist die Anfertigung von kombinierten mikrofluidischen Systemen aus Mikronadeln und passenden Mikrokanälen, da dafür normalerweise viele aufwändige Prozessschritte bis zur Fertigstellung notwendig sind [83–86]. In Kapitel 7 wird ein hybrider Ansatz vorgestellt, welcher die Fertigung von mittels Zwei-Photonen-Polymerisation erzeugten Mikronadeln und durch ultrakurze Laserpulse generierten Mikrokanälen vereint. Der Herstellungsprozess wurde dahingehend optimiert, dass für beide Prozesse ein einziger Laser ausreicht und ein mikrofluidisches System mit wenigen Prozessschritten erzeugt werden kann. Die Anwendbarkeit des Systems wird ebenfalls in Kapitel 7 diskutiert.

Folgerung

Die betrachteten Anwendungsgebiete zeigen, dass die Zwei-Photonen-Polymerisation bislang hauptsächlich zur Anfertigung von mikroskopischen Objekten diente. Das liegt daran, dass diese Technik nach wie vor recht lange Prozessdauern mit sich bringt. Durch paralleles Bearbeiten des fotosensitiven Materials mit mehreren Teilstrahlen und Anpassen des gleichzeitig polymerisierten Volumens kann der Prozess beschleunigt werden. Eine weitere Überlegung ist die Kombination mit anderen Herstellungsverfahren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein vielversprechendes Konzept zur Kombination von Stereolithografie und Zwei-Photonen-Polymerisation entwickelt. Eine detaillierte Beschreibung des hybriden Prozesses und erster Erfolge in der Umsetzung dieses Verfahrens werden in Kapitel 6 präsentiert. Im folgenden Kapitel wird zunächst ein Überblick über das Gesamtsystem für Zwei-Photonen-Polymerisation gegeben und auch auf die Systemerweiterung um einen Laser für die Stereolithografie eingegangen.

ÜBERBLICK ÜBER DAS GESAMTSYSTEM

In Zusammenarbeit mit der Firma Optec¹ wurde ein Konzept für ein System zur Fertigung von dreidimensionalen Objekten mittels Zwei-Photonen-Polymerisation erarbeitet. Ein erster Prototyp mit zwei Ultrakurzpulslasern, einem optischen Tisch mit modifizierbarem optischen Aufbau, einem Nano-Positioniersystem mit eigener Steuerungssoftware von Optec zum Erstellen dreidimensionaler Objekte und einem Kameraaufbau zur Beobachtung des Schreibprozesses wurde von der Firma Optec aufgebaut. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses System verändert und weiterentwickelt um zunächst erste dreidimensionale Formen und anschließend komplexere medizintechnische Funktionselemente mit hoher Auflösung zuverlässig und reproduzierbar zu generieren. Im Folgenden wird das gesamte System vorgestellt. Dabei wird auch näher auf durchgeführte Verbesserungen am Aufbau und auf Systemerweiterungen für einige der Untersuchungen eingegangen.

3.1 SYSTEM MIT ZWEI ULTRAKURZPULSLASERN

Die meisten dreidimensionalen Strukturen werden mit einem in Abbildung 3.1 schematisch dargestellten System realisiert. Ein Ytterbium-dotierter Faserlaser mit SHG-Modul² liefert Laserpulse bei einer Wellenlänge von 515 nm mit einer Repetitionsrate von 55 MHz, einer Pulslänge von 267 fs und einer mittleren Ausgangsleistung von 550 mW. Als weitere Lichtquelle ist ein Erbium-dotierter Faserlaser³ im Aufbau integriert. Dieser stellt bei einer Wellenlänge von 780 nm Laserpulse mit einer Repetitionsrate von 80 MHz, einer Pulslänge von 100 fs und einer mittleren Ausgangsleistung von 160 mW bereit. Die beiden Laserstrahlen werden von einem unteren optischen Tisch auf einen darüber liegenden optischen Tisch mit einem variablen optischen Aufbau geführt.

Dort wird die Laserleistung zunächst mit einem akustooptischen Modulator⁴ (AOM) reguliert und die erste Ordnung nach dem AOM als Prozessstrahl verwendet. Um die Leistung der ersten Ordnung zu überprüfen wird ein Referenzstrahl mit Hilfe eines Strahlteilers (ST) abgegriffen. Eine Apertur (A) sorgt dafür, dass nur die erste Ordnung den nachfolgenden Strahlengang zur Probe passiert. Mit einem Shutter wird das An- und Ausschalten der Strahlung während des Schreibprozesses geregelt. Außerdem wird das Licht mit einer $\lambda/4$ -Wellenplatte (QWP) zirkular polarisiert und mit einem Strahlaufweiter aufgeweitet um eine optimale Fokussierung nach dem

¹ Optec S.A., Belgien

² Amplitude Systems, Mikan

³ Toptica, Femtofiber Pro NIR

⁴ NEOS Technologies, 23080-3-LTD

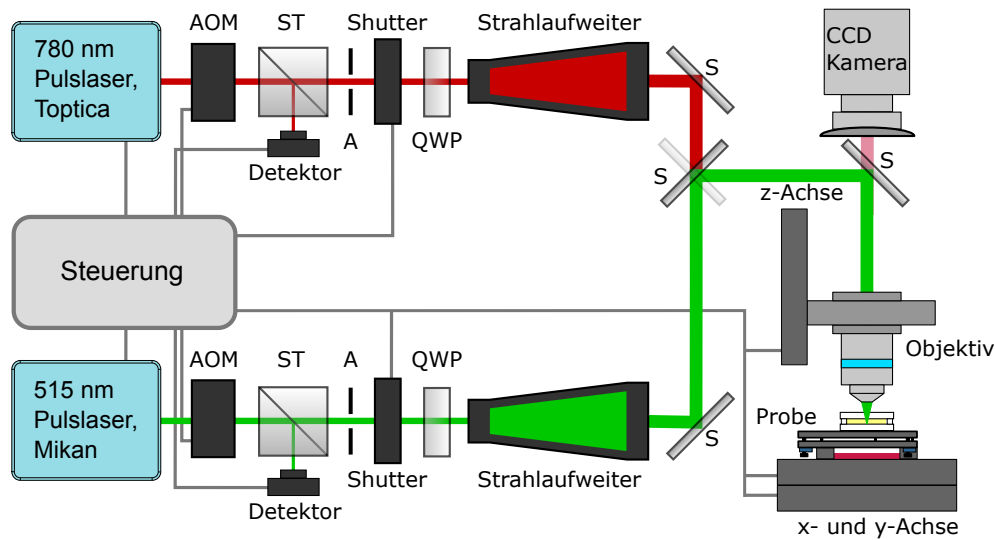


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Systems mit zwei Ultrakurzpulslasern zur Herstellung dreidimensionaler Strukturen mittels Zwei-Photonen-Polymerisation: (AOM) akustooptischer Modulator, (ST) Strahlteiler, (A) Apertur, (QWP) $\lambda/4$ -Wellenplatte, (S) Spiegel.

Objektiv zu erzielen. Für einige Untersuchungen wird die Laserleistung zusätzlich durch in den Strahlengang eingebrachte Strahlteiler reduziert, indem ein Teil des Laserlichts zu einem Strahlauffänger geleitet wird. Insgesamt ist der optische Aufbau derart angepasst worden, dass ein schneller Wechsel zwischen den beiden Lichtquellen möglich ist. Hierfür muss nur ein Spiegelmodul in einer festen Steckverbindung ausgetauscht und minimal nachjustiert werden. Dieser Spiegel lenkt den Strahl zum Bearbeitungsbereich des Systems.

Durch ein Objektiv wird der Laserstrahl zur Probe geführt. Für die Belichtung des Materials werden drei verschiedene Objektive verwendet. Zwei der Objektive eignen sich dazu Material zu modifizieren, welches zwischen einem Substrat und einem Deckglas aufgetragen wird oder durch Rotationsbeschichtung auf ein Substrat aufgebracht wird (siehe Abbildung 3.2). Für eine höhere Auflösung wird ein ZEISS LD Plan-Neofluar 63x Objektiv mit einer NA von 0,75 eingesetzt und für eine geringere Auflösung ein ZEISS EC Epiplan-Neofluar 20x Objektiv mit einer NA von 0,5. Die höchste Auflösung wird mit einem ZEISS EC Plan-Neofluar 100x Immersionsobjektiv erzielt, welches eine NA von 1,3 aufweist und, wie Abbildung 3.2 veranschaulicht, direkt in einen Tropfen fotoempfindliches Material eingetaucht wird. Das Objektiv ist an einem Nano-Positioniersystem⁵ befestigt und entlang der Richtung des Laserstrahls beweglich. Die Probenhalterung ist überdies auf einem weiteren Nano-Positioniersystem⁶ fixiert. Dieses ist in der Ebene senkrecht zum einfallenden Laserstrahl positionierbar und befähigt dazu den Fokus innerhalb des Photoresists dreidimensional zu bewegen.

Der Belichtungsprozess lässt sich mit einer eingebauten CCD Kamera überwachen. Neben den Umrissen der polymerisierten Strukturen und einem helleren Punkt im

⁵ Aerotech, ANT-95-50-L-PLUS

⁶ Aerotech, ANT-130-110-XY-PLUS

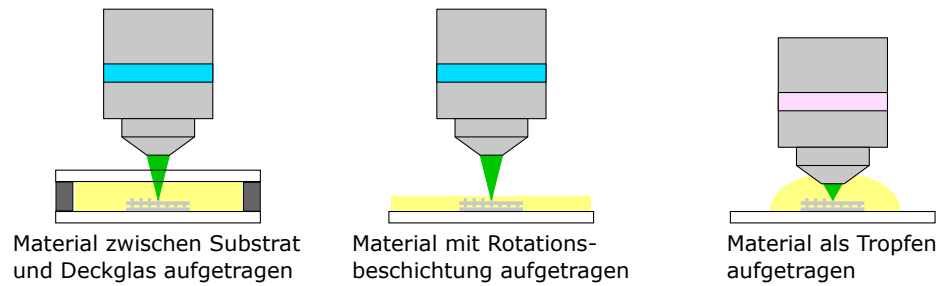


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung verschiedener Möglichkeiten mit einem Objektiv das fotosensitive Material zu belichten.

Bereich des fokussierten Lichts ist bei zu hohen Laserleistungen eine Blasenbildung im Material und bei zu geringer Laserleistung keine Veränderung zu beobachten. Darüber hinaus wird die Kamera dafür verwendet eine 15 nm dicke Goldmarkierung, welche durch einen Sputterprozess auf das Substrat aufgetragen wurde, zu finden. Auf diese Weise wird die Grenzfläche zwischen Substrat und Photoresist identifiziert um Strukturen in der richtigen Höhe auf dem Substrat zu platzieren. Das vorgestellte System eignet sich für die Herstellung dreidimensionaler Objekte mit einer Größe von einigen Zentimetern und einer Auflösung von etwa hundert Nanometern.

3.2 VERBESSERUNGEN AM SYSTEM

Für eine zuverlässige Erzeugung von beliebigen Strukturen wurde das System im Rahmen dieser Arbeit in einigen Punkten optimiert. Es wurde das Kamerasystem zur Prozessüberwachung ausgetauscht und eine neue Probenhalterung für eine ergänzende Neigungskorrektur der Proben entworfen und integriert. Darüber hinaus wurde ein Konzept zur geschwindigkeitsabhängigen Leistungsregulierung erarbeitet und umgesetzt.

Das ursprünglich im Aufbau für Zwei-Photonen-Polymerisation integrierte Kamerasystem mit Auflichtbeleuchtung (siehe Abbildung 3.3 (a)) wurde durch ein Kamerasystem mit Durchlichtbeleuchtung ersetzt, wie es in Abbildung 3.3 (b) skizziert ist. Damit werden nicht nur Goldmarkierungen auf dem Substrat erkannt, die dazu dienen die Grenzfläche zwischen Substrat und Photoresist zu bestimmen sowie Strukturen mit dem richtigen Abstand zum Substrat herzustellen, sondern auch die polymerisierten Strukturen im Material sichtbar. Eine LED Hintergrundbeleuchtung bei 633 nm wurde unterhalb der Probe angebracht und die Kamera durch eine CCD Kamera⁷ mit höherer Auflösung ersetzt. Durch eine in der Höhe verstellbare Tubuslinse lassen sich zudem der Laserfokus und die mit der Kamera detektierte Grenzfläche zwischen Substrat und Photoresist auf die gleiche Höhe justieren. Mit dem neuen Aufbau kann der gesamte Schreibprozess direkt verfolgt und die fertigen Strukturen im Material betrachtet werden.

Durch eine justierbare Probenhalterung (siehe Abbildung 3.3 (c)) kann überdies die Oberfläche des Substrats senkrecht zum einfallenden Laserlicht ausgerichtet werden. Die Halterung besteht aus einer oberen Probenplatte, welche, wie bei einer kinema-

⁷ The Imaging Source Europe, DMK 23U274

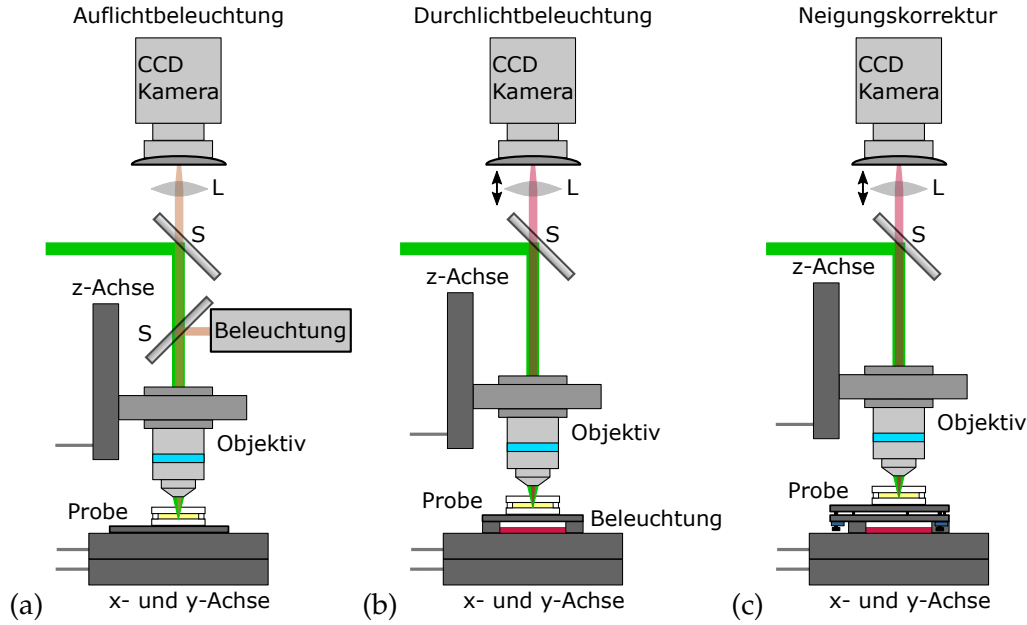


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung (a) des ursprünglichen Systems mit Auflichtbeleuchtung und des verbesserten Systems mit (b) Durchlichtbeleuchtung und (c) Neigungskorrektur.

tischen Spiegelhalterung, durch Federn und eine Kugel unter Spannung mit einer darunterliegenden Platte verbunden ist. Durch zwei Linearaktoren⁸ wird die Verkipfung der Probenplatte zur unteren Platte eingestellt und die Probe ausgerichtet. Dafür werden drei Punkte auf der Oberfläche des Substrats mit der Kamera fokussiert und durch Verstellen der Platte iterativ auf die gleiche Höhe angepasst. Diese Neigungskorrektur verhindert, dass die generierten Strukturen aufgrund einer schrägen Probe schief auf dem Substrat stehen.

Um Überbelichtung an Anfangs- und Endpunkten eines geschriebenen Objekts, die durch eine zu hohe Laserleistung bei zu geringer Geschwindigkeit hervorgerufen wird, zu vermeiden, wurde die Ansteuerung des AOMs modifiziert. Eine Regulierung der Laserleistung mittels AOM während der Beschleunigungsphasen des Positioniersystems verbessert den Polymerisationsunterschied an diesen Punkten erkennbar. Dazu wird jeweils ein analoges Spannungssignal von den drei Achsen des Positioniersystems abgegriffen. Diese Spannungssignale U_i sind proportional zum Geschwindigkeitsbefehl v_i , welcher an die Achsen x , y und z übermittelt wird. Es gilt somit

$$U_i = a v_i \quad \text{für } i = x, y, z \quad (3.1)$$

mit einem Proportionalitätsfaktor a . Eine konzipierte Schaltung (siehe Anhang A.2) wandelt diese Spannungssignale in ein Spannungssignal U proportional zum Vektorbetrag der Geschwindigkeiten $|\mathbf{v}|$ um.

$$U \propto |\mathbf{v}| = \sqrt{v_x^2 + v_y^2 + v_z^2} \quad (3.2)$$

⁸ Physik Instrumente, PiezoMike Linearaktor

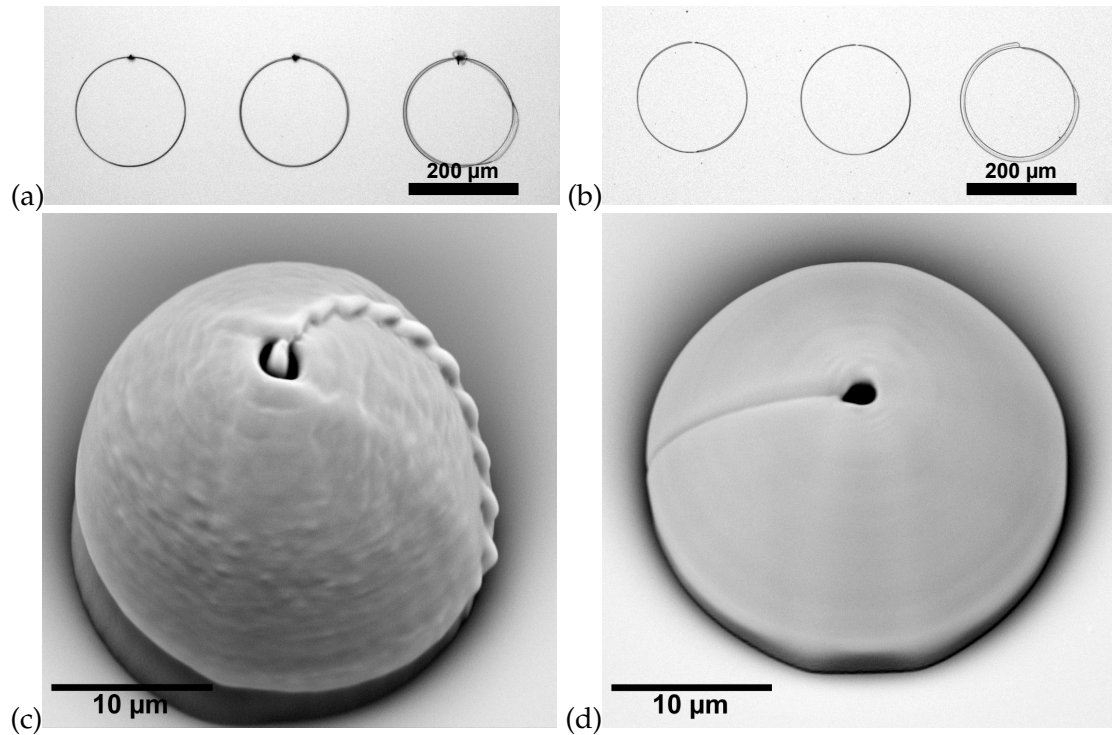


Abbildung 3.4: Rasterelektronenmikroskop (REM)-Aufnahmen von Kreisen (a) ohne Leistungsregulierung und (b) mit Leistungsregulierung und von einer Hemisphäre (c) ohne optimierte Leistungsregulierung und (d) mit optimierter Leistungsregulierung.

Die resultierende Spannung ändert sich mit der Geschwindigkeit des Laserfokus entlang seines Weges im dreidimensionalen Raum. Bevor das Spannungssignal an die Steuerung des AOMs weitergegeben wird um die Laserleistung nachzuregulieren, wird es noch mit einem festen in Versuchen ermittelten Faktor und einem festen Korrekturwert angepasst. Diese Korrektur der Laserleistung abhängig von der Geschwindigkeit ist näherungsweise linear und nicht quadratisch, wie aufgrund der quadratischen Intensitätsabhängigkeit der Zwei-Photonen-Polymerisation zu erwarten wäre. Sie reicht jedoch aus um die zu stark polymerisierten Stellen ausreichend zu reduzieren. Im G-Code, welcher zum Erstellen der dreidimensionalen Strukturen verwendet wird, wurden dafür die Befehle für das Abgreifen der Spannungssignale (ANALOG TRACK Befehl) eingefügt und die Regulierung der Laserleistung entsprechend abgeändert.

Der Unterschied zwischen mit und ohne Leistungsregulierung hergestellten Strukturen ist bei den geschriebenen Teststrukturen deutlich erkennbar. Zweidimensionale, auf ein Substrat geschriebene Kreise weisen ohne Regulierung unkontrolliert polymerisierte Stellen am Anfangs- und Endpunkt des Kreises auf (siehe Abbildung 3.4 (a)), welche durch Anpassung der Laserleistung vermieden werden (siehe Abbildung 3.4 (b)). Auch bei den in Abbildung 3.4 gezeigten dreidimensionalen Hemisphären gibt es einen sichtbaren Unterschied zwischen der Struktur ohne (c) und mit optimierter (d) Leistungsänderung während des Bearbeitungsprozesses. Die Struktur in Abbildung 3.4 (c) hat aufgrund der höheren Lichtdosis an den Anfangs- und Endpunkten auffällige Auswölbungen an der Struktur, wohingegen bei der Struktur in Abbildung

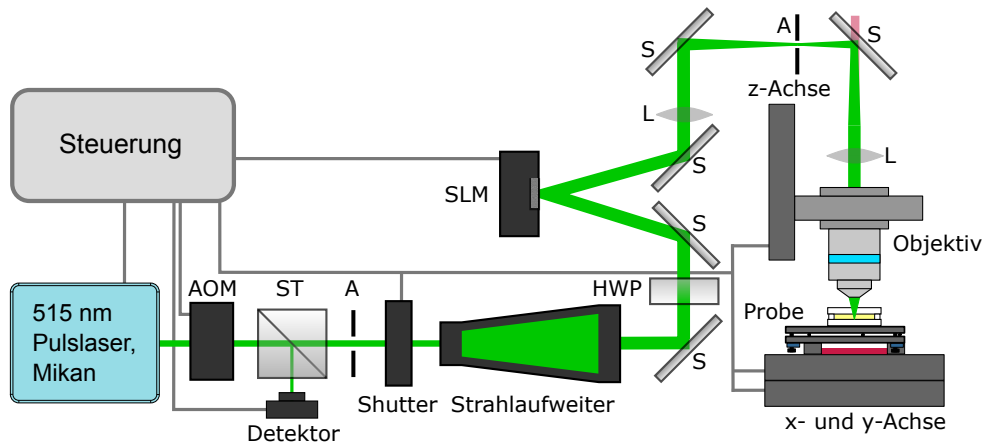


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des Aufbaus zu Strahlmodulation mittels eines räumlichen Lichtmodulators (SLM).

3.4 (d) nur eine feine Linie an den Anfangs- und Endpunkten sichtbar ist. Durch diese Verbesserung ist ein sauberes Anfertigen von beliebigen dreidimensionalen Objekten möglich.

3.3 SYSTEMERWEITERUNGEN

Das in Abschnitt 3.1 vorgestellte System zur Herstellung dreidimensionaler Strukturen wird für einige der durchgeführten Experimente um weitere Lichtquellen und einen räumlichen Lichtmodulator erweitert. Ein zusätzlicher Ultrakurzpuls laser mit variabler Repetitionsrate und Pulslänge wird dazu verwendet den Einfluss dieser beiden Parameter auf die Zwei-Photonen-Polymerisation zu untersuchen. Zudem kommt ein Laser mit einer Wellenlänge von 405 nm für Stereolithografie mittels linearer Absorption zum Einsatz. Durch die Integration eines räumlichen Lichtmodulators kann der Laserstrahl geformt und in mehrere Teilstrahlen aufgespalten werden.

3.3.1 Räumlicher Lichtmodulator

Das Laserdirektschreiben mit nur einem fokussierten Laserstrahl ist aufgrund der punktuellen Polymerisation im Bereich des Fokus sehr zeitintensiv. Eine Aufteilung des Laserstrahls in mehrere Teilstrahlen und ein paralleles Schreiben mehrerer Strukturen kann die Prozessdauer erheblich reduzieren [87, 88]. Zudem ist es möglich durch Strahlformung Einfluss auf den polymerisierten Bereich zu nehmen [89, 90]. Sowohl eine Strahlaufteilung als auch eine Strahlformung können durch einen räumlichen Lichtmodulator (SLM) erzielt werden. Deshalb wurde ein SLM nach dem Vorbild entsprechender Aufbauten aus der Literatur [91–93] in das System integriert.

Der optische Aufbau ist in Abbildung 3.5 schematisch dargestellt. Zunächst wird der Laserstrahl soweit aufgeweitet, dass er das Display des Lichtmodulators⁹ gut ausfüllt aber keine Randeﬀekte erzeugt werden. Zudem wird die Polarisationsrichtung des

⁹ Holoeye, Pluto VIS-021-C

linear polarisierten Laserstrahls mit einer $\lambda/2$ -Wellenplatte (HWP) entlang der langen Displayachse ausgerichtet, damit diese parallel zur Ausrichtung der Moleküle des Flüssigkristalls ist und nur Phasenmodulation auftritt. Der Laserstrahl fällt in einem möglichst kleinen Einfallswinkel auf den SLM um den Strahlversatz aufgrund des Brechungsunterschieds zwischen Luft und Flüssigkristallzelle klein zu halten. Durch ein auf den SLM geladenes computergeneriertes Hologramm wird der Laserstrahl vom SLM moduliert reflektiert. Ein 4f-Aufbau nach dem SLM wird dazu genutzt in der Fourierebene alle bis auf die erste Beugungsordnung zu blocken, so dass nur das Bild der ersten Ordnung zur Probe gelangt. Die Linsen für diesen Aufbau haben eine Brennweite von 300 mm. Ein Objektiv fokussiert den Strahl auf die Probe. Die Belichtung der Probe wird mit der CCD Kamera beobachtet.

3.3.2 *Ultrakurzpulslaser mit variabler Repetitionsrate und Pulslänge*

Die im System verbauten Ultrakurzpulslaser von Toptica und Amplitude Systems (siehe Abschnitt 3.1) emittieren Laserpulse bei einer festen Repetitionsrate und Pulslänge. Für weiterführende Untersuchungen zu diesen Parametern wird ein Lasersystem¹⁰ mit variabler Repetitionsrate und Pulslänge eingesetzt. Dieses besitzt eine Ausgangswellenlänge von 1030 nm, welche mit einem Zusatzmodul zur Frequenzverdopplung auf 515 nm halbiert wird. Die Ausgangsleistung lässt sich über einen im System enthaltenen AOM einstellen und erreicht Werte von bis zu 3,5 W. Zudem werden feste Werte für die Repetitionsrate in der Systemsoftware festgelegt. Die Pulslänge des Lasers lässt sich mittels eines Pulse Stretcher variieren. Zur Messung der Pulslänge wird ein Autokorrelator¹¹ verwendet. Für die Repetitionsraten 50 kHz, 100 kHz, 500 kHz, 1 MHz, 3 MHz 5 MHz und 10 MHz werden geeignete Einstellungen am Pulse Stretcher für die Pulslängen 420 fs, 540 fs und 1,6 ps bestimmt. Bei 10 MHz sind überdies Pulslängen von 345 fs, 2,8 ps und 4,3 ps einstellbar.

Das zusätzliche Lasersystem wird in das bereits bestehende System integriert, wie die schematische Darstellung in Abbildung 3.6 veranschaulicht. Der Laserstrahl wird ebenfalls mit einem Strahlaufweiter aufgeweitet um eine stärkere Fokussierung nach dem Objektiv zu erreichen. Anschließend wird der Strahl im Bearbeitungsbereich durch ein Objektiv fokussiert und zur Probe geführt. Es finden dabei die Objektive, die Probenpräparation und das Achsensystem aus Abschnitt 3.1 für die Polymerisation von verschiedenen fotoempfindlichen Materialien Anwendung.

3.3.3 *Laser für Stereolithografie mittels linearer Absorption*

Die bislang verwendeten Ultrakurzpulslaser sind dafür ausgelegt Materialien mittels Zwei-Photonen-Absorption auszuhärten. Alternativ besteht die Möglichkeit Materialien durch lineare Absorption von Licht in einem entsprechenden Wellenlängenbereich zu modifizieren. Zur Anfertigung von dreidimensionalen Objekten mit dieser Methode eignen sich Systeme, die mit einer Wellenlänge von 405 nm [94–96] arbeiten. Mit dem Ziel Zwei-Photonen-Polymerisation und die schnellere aber weniger hoch auflösende

¹⁰ Menlo Systems, BlueCut

¹¹ APE, pulseCheck

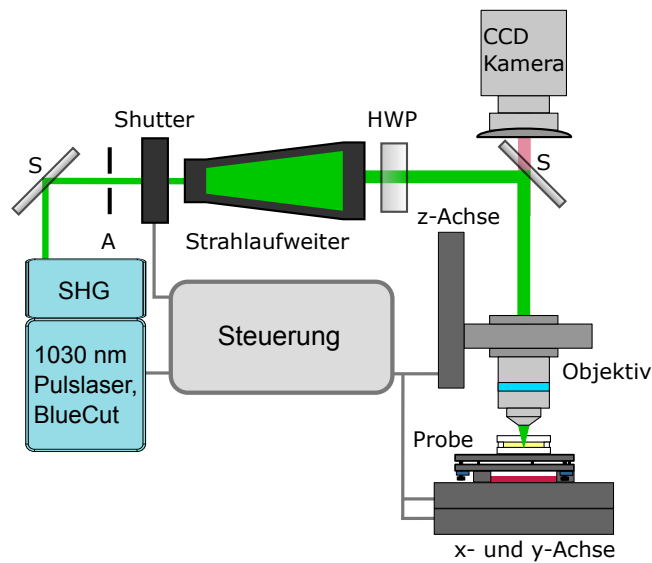


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Erweiterung des Systems mit einem zusätzlichen Ultrakurzpuls laser.

Stereolithografie mittels linearer Absorption zu vereinen, wurde der Aufbau um einen entsprechenden 405 nm Laser ergänzt.

Ein kompakter Dauerstrichlaser¹² (cw-Laser) mit einer Wellenlänge von 405 nm und einer maximalen Ausgangsleistung von 60 mW wird mit einem dichroitischen Spiegel¹³ vor dem Objektiv in den Strahlengang eingebracht (siehe Abbildung 3.7). Der dichroitische Spiegel wurde dafür konzipiert die Wellenlängen 515 nm, 633 nm und 780 nm zu transmittieren und 405 nm zu reflektieren. Damit können die bereits vorhandenen Laser und die Durchlichtbeleuchtung weiterhin neben der 405 nm Lichtquelle genutzt werden. Die Laserleistung des cw-Lasers kann entweder in der dazugehörigen Software auf einen festen Wert eingestellt werden oder mittels eines analogen Spannungssignals moduliert werden. Eine geschwindigkeitsabhängige Anpassung der Leistung dieses Lasers wird in der in Abschnitt 3.2 diskutierten Schaltung (siehe Anhang A.2) zur Leistungsregulierung bereits berücksichtigt. Außerdem kann der Leistungsbereich durch zusätzlich eingesetzte Filter verkleinert und damit eine geeignete Laserleistung zur Polymerisation in die Materialien eingebracht werden.

3.4 ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde ein Gesamtsystem zur erfolgreichen Anfertigung medizintechnischer Funktionselemente realisiert. Das in Abschnitt 3.1 vorgestellte System mit zwei Ultrakurzpuls lasern wurde für die Untersuchung verschiedener Materialien (siehe Abschnitt 4.1), für die Lichtmodulation (siehe Abschnitt 4.3.3), für die Herstellung von Gerüststrukturen für Zellstudien (siehe Kapitel 5) und die Generierung von ersten Mikronadeln (siehe Abschnitt 7.2.1) verwendet. Zudem wurde das System zur Lichtmodulation um

¹² Omicron, Luxx 405-60

¹³ Laser Components, HR405+670HT515+633+780/45/BBAR PW1008UV

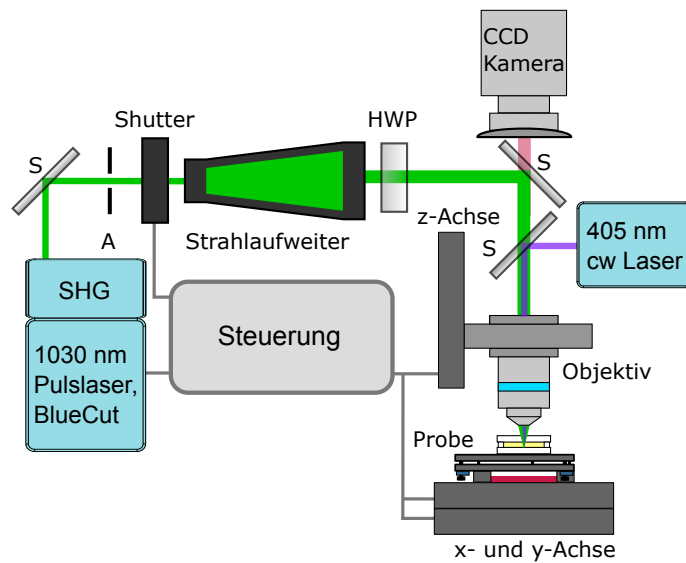


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Erweiterung des Systems mit zusätzlichem Ultrakurzpulslaser und 405 nm cw-Laser.

einen Aufbau mit räumlichem Lichtmodulator erweitert. Ein Ultrakurzpulslaser mit variabler Repetitionsrate und Pulslänge ermöglichte darüber hinaus die Bestimmung der nichtlinearen Absorptionsordnung (siehe Abschnitt 4.2) und wurde ebenfalls zur Herstellung von Gerüststrukturen (siehe Kapitel 6) und Mikronadeln (siehe Abschnitte 7.2.2 und 7.2.3) herangezogen. Der zusätzliche Aufbau für Stereolithografie mittels linearer Absorption wurde für die Vereinigung von Laserdirektschreiben mittels Zwei-Photonen-Polymerisation und Stereolithografie in Kapitel 6 eingesetzt.

HERSTELLUNGSPROZESS

Für einen erfolgreichen Herstellungsprozess ist neben dem in Kapitel 3 vorgestellten Gesamtsystem die Auswahl geeigneter fotoempfindlicher Materialien von Bedeutung. Deshalb wird in diesem Kapitel das Polymerisationsverhalten verschiedener Materialien betrachtet und anschließend auf die Bestimmung von optimalen Prozessparameter eingegangen. Für die Hybridpolymere OrmoCore, OrmoClad und OrmoComp[®] wird für eine Wellenlänge von 515 nm zudem die nichtlineare Absorptionsordnung experimentell ermittelt. Eine Optimierung des zeitaufwändigen Herstellungsprozesses kann durch Strahlmodulation erzielt werden. Erste Strahlmodifikationen mit einem räumlichen Lichtmodulator werden in diesem Kapitel präsentiert.

4.1 POLYMERISATIONSVERHALTEN VERSCHIEDENER MATERIALIEN

Ultrakurzpulslaser im nahen Infrarotbereich sind eine etablierte Lichtquelle für die Zwei-Photonen-Polymerisation von unterschiedlichen fotosensitiven Materialien [97–99]. Zudem finden Ultrakurzpulslaser im sichtbaren Bereich Anwendung [100–102], welche aufgrund ihrer kleineren Wellenlänge nach der Abbeschen Theorie eine höhere Auflösung ermöglichen. Bei der Wahl einer kleineren Wellenlänge kann es jedoch abhängig vom Material vorkommen, dass das Material diese Wellenlänge bereits linear absorbiert und keine Zwei-Photonen-Absorption auftritt.

Die Anwendbarkeit eines 515 nm Ultrakurzpulslasers wird für verschiedene kommerziell erhältliche fotosensitive Materialien geprüft, welche das Potenzial haben geeignete Kandidaten für eine Zwei-Photonen-Polymerisation zu sein. Diese schließen die organisch-anorganischen Hybridpolymere OrmoCore, OrmoClad und OrmoComp[®]¹ ein, welche bereits für das Laserdirektschreiben bei 515 nm verwendet wurden [44, 45, 100, 103]. Außerdem wird SU-8² betrachtet, welches bislang sowohl für die Aushärtung mittels linearer Absorption [104–106] als auch Zwei-Photonen-Polymerisation mit Ultrakurzpulslasern im nahen Infrarotbereich [107–109] genutzt wurde. Ein weiteres herangezogenes Photoresist ist IP-Dip³ [69, 110–113]. Dieses wurde für Zwei-Photonen-Polymerisation bei 780 nm maßgeschneidert und hat den Vorteil einer einfachen Handhabung, da das Objektiv direkt in das Material eingetaucht wird. Zusätzlich werden das Negativ-Resist mr-DWL⁴ [114, 115], ein Standardmaterial für Polymerisation bei 405 nm, und E-Shell 600⁵, ein lichtaushärtendes Material für die additive Fertigung

¹ micro resist technology

² MicroChem Corp., SU-8 2010

³ Nanoscribe

⁴ micro resist technology, mr-DWL-5

⁵ Envision TEC

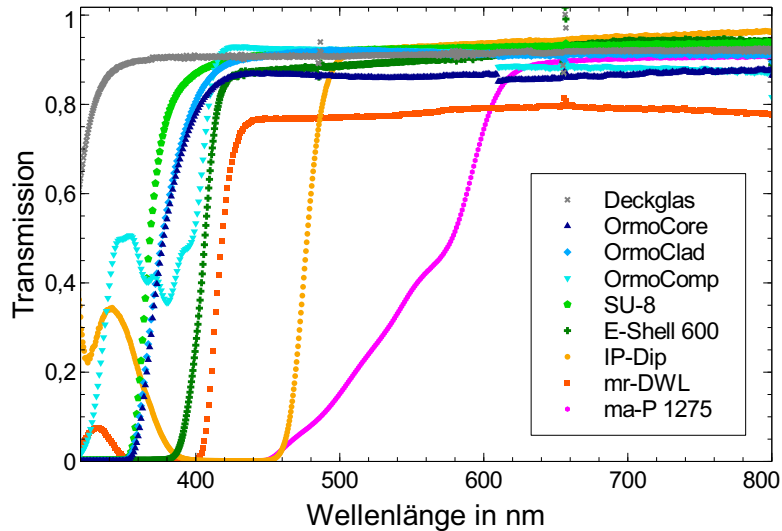


Abbildung 4.1: Transmissionsspektren verschiedener fotosensitiver Materialien.

von Medizinprodukten, getestet. Neben diesen Photopolymeren wird das Positiv-Photoresist ma-P 1275⁶ [52, 116] evaluiert.

4.1.1 Transmissions- und Reflexionsmessung

Um erste Informationen darüber zu erhalten, ob die Materialien für eine Zwei-Photonen-Polymerisation bei 515 nm geeignet sind, wird eine Messung der Transmission und Reflexion durchgeführt. Die mit einem Spektrometer⁷ aufgenommenen Transmissions- und Reflexionsspektren liefern zugleich Auskunft über die Absorption des Lichts im Material. Es werden Proben mit einer homogenen Schicht aus fotoempfindlichem Material zwischen zwei dünnen Deckgläsern mit einer Dicke von $(170 \pm 10) \mu\text{m}$ präpariert. Dafür werden die gleichen Abstandshalter zwischen den Deckgläsern verwendet wie bei den Proben für die Zwei-Photonen-Polymerisation, welche einen Zwischenraum und somit eine Schichtdicke des fotoempfindlichen Materials von $(270 \pm 60) \mu\text{m}$ generieren. Die Proben werden nacheinander in einer abgedunkelten Probenkammer unter Anwendung einer Halogenlichtquelle und einer Deuteriumlichtquelle analysiert und Spektren in einem Wellenlängenbereich von 320 nm bis 800 nm mit einer Schrittweite von 1 nm und einem Mittelwert aus zwei Einzelmessungen aufgenommen. Die Energie der beiden kontinuierlichen Lichtquellen sollte primär eine lineare Absorption des Lichts im Material hervorrufen.

Es zeigt sich, dass die Reflexion der Materialien vernachlässigbar klein ist. Somit reichen die Transmissionsmessungen aus um Rückschlüsse auf das Absorptionsverhalten der Materialien ziehen zu können. Die wellenlängenabhängigen Transmissionskurven sind in Abbildung 4.1 dargestellt. Die verwendeten Deckgläser werden auch untersucht und sind ab einer Wellenlänge von etwa 350 nm transparent. Die Transmissionskurven von Proben mit OrmoCore, OrmoClad, OrmoComp[®], SU-8 und E-Shell 600 steigen auf

⁶ micro resist technology, ma-P 1275G

⁷ Instrument Systems Spectro 320

einen vergleichbaren Wert wie die Deckgläser von etwa 0,9 an, welcher vor oder spätestens bei einer Wellenlänge von 400 nm erreicht wird und für größere Wellenlängen gleichbleibend ist. Dies impliziert, dass die Proben für größere Wellenlängen transparent sind. Die Wahrscheinlichkeit für eine lineare Absorption bei 515 nm ist daher sehr gering und eine nichtlineare Absorption kann als dominierender Effekt auftreten. Dies wird für die Hybridpolymere dadurch belegt, dass diese Materialien bereits für Laserdirektschreiben mittels Zwei-Photonen-Polymerisation bei 515 nm erfolgreich eingesetzt wurden [100, 103]. IP-Dip erreicht eine maximale Transmission erst bei etwa 500 nm, so dass sowohl lineare als auch nichtlineare Absorption bei 515 nm denkbar sind. Die Transmissionsmessungen von mr-DWL und ma-P 1275 weichen von den anderen Ergebnissen stärker ab. Bei mr-DWL ist die maximale Transmission wesentlich geringer als bei den zuvor beschriebenen Materialien und bei ma-P 1275 ist die Transmission bei 515 nm gering und nimmt bis 600 nm zu. Deshalb ist eine lineare Absorption des Lichts bei einer Wellenlänge von 515 nm zu erwarten.

4.1.2 Bestimmung geeigneter Prozessparameter

In einem nächsten Schritt wird untersucht, ob die fotosensitiven Materialien bei einer Wellenlänge von 515 nm eine für die Zwei-Photonen-Polymerisation charakteristische Aushärtung des Materials im Bereich des Fokus aufweisen. Anschließend werden für unterschiedliche Schreibgeschwindigkeiten passende Prozessparameter ermittelt. Dafür wird der in Abschnitt 3.1 präsentierte Aufbau verwendet, welcher neben einem 515 nm Ultrakurzpulslaser eine Bestrahlung der Materialien mit einem Ultrakurzpulslaser bei 780 nm erlaubt. Dadurch können die erzielten Ergebnisse bei 515 nm überdies mit dem Polymerisationsverhalten im nahen Infrarotbereich verglichen werden.

Zur Bestimmung einer geeigneten materialabhängigen Laserleistung für den Polymerisationsprozess werden einzelne Voxel und Linien in die Materialien geschrieben. Dafür werden die Photoresiste entweder zwischen einem Substrat und einem Deckglas aufgetragen oder auf ein Substrat mittels Rotationsbeschichtung aufgebracht (siehe Abbildung 3.2). Unter Berücksichtigung der Verarbeitungsrichtlinien werden zusätzlich zur Bestrahlung der Materialien mit Ultrakurzpulslaser weitere Prozessschritte (Erhitzen der Probe vor und/oder nach dem Belichten, Entwickeln, Reinigen) durchgeführt.

Für die Generierung der Voxel werden einzelne Punkte in einer Matrix mit von unten nach oben schrittweise ansteigender z-Position (von im Substrat liegenden Punkten bis hin zu Punkten oberhalb des Substrats) und von links nach rechts stufenweise steigender Laserleistung im Material belichtet. Die Belichtungszeit beträgt dabei in der Regel 1 ms. Abbildung 4.2 zeigt exemplarisch eine der Matrizen geschrieben mit einer Wellenlänge von 515 nm. Durch die Variation der Höhe liegen die unteren Voxel noch tief im Substrat, wohingegen die oberen Voxel teilweise beim Entwickeln der Probe abgelöst wurden oder soweit aus dem Substrat herausragen, dass sie umgefallen sind. Die längliche Form der Voxel resultiert aus der ebenfalls länglichen Intensitätsverteilung des fokussierten Laserstrahls. Bei einer zu geringen Laserleistung fehlen Voxel in den Matrizen und bei einer zu hohen Leistung findet eine unkontrollierte Polymerisation statt und es entstehen unförmige Strukturen.

Durch eine Analyse der erzeugten Matrizen lässt sich für fast alle Photoresiste der Leistungsbereich für die Polymerisation von einzelnen Punkten eingrenzen. Hierbei muss mr-DWL ausgeschlossen werden, da dieses bei kleinen Laserleistungen nicht

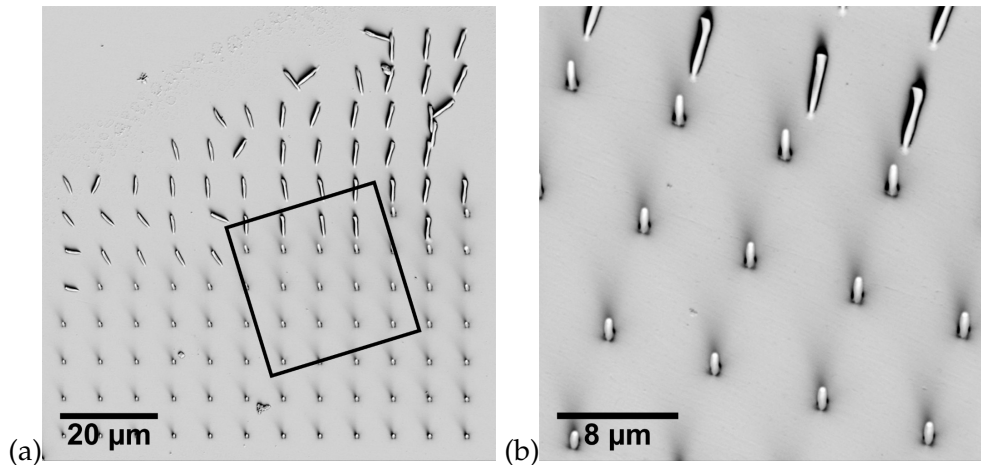


Abbildung 4.2: REM-Aufnahmen (a) einer Matrix aus Voxeln mit von unten nach oben schrittweise ansteigender z -Position (von im Substrat liegenden Punkten bis hin zu Punkten oberhalb des Substrats) und von links nach rechts stufenweise steigender Laserleistung und (b) eine Vergrößerung des in (a) markierten Ausschnitts.

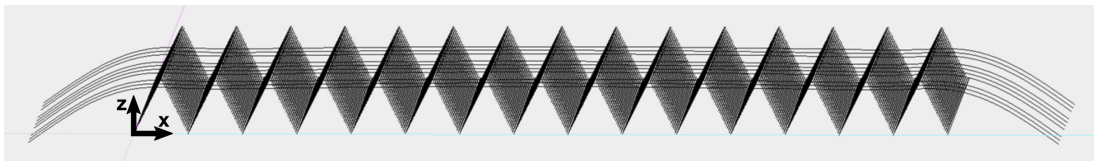


Abbildung 4.3: Teststruktur aus Linien eingebettet in einer Stützstruktur.

und bei höheren Leistungen unkontrolliert polymerisiert. Dazwischen konnte kein Bereich zur Herstellung von Voxeln gefunden werden. Dies legt nahe, dass entweder der geeignete Leistungsbereich sehr klein ist und daher nicht gefunden wurde oder ein Prozess im Material stattfindet, welcher keine Ausbildung von definierten Strukturen zulässt.

Für eine genauere Bestimmung des Leistungsbereiches zur Anfertigung dreidimensionaler Strukturen mit unterschiedlichen Schreibgeschwindigkeiten wurde eine spezielle Teststruktur entworfen. Bei dieser sind Linien, welche zur Feststellung passender Laserleistungen dienen, in Stützstrukturen eingebettet (siehe Abbildung 4.3). Die Grundform der Stützstruktur bilden dreiseitige, gerade Prismen, welche aneinandergereiht sind und direkt vor den Linien in das gleiche Material geschrieben werden. Die Stützstruktur verhindert, dass die Linien von Oberflächeneffekten zwischen Substrat und Photoresist beeinflusst werden, und bietet den Vorteil, dass außerdem die Stabilität der freistehenden Liniensegmente analysiert werden kann.

Für die Materialien OrmoCore, OrmoClad, OrmoComp[®], SU-8 und E-Shell 600 wird die Teststruktur erfolgreich erzeugt und es können optimale Prozessfenster für diese fünf Materialien definiert werden. Das Prozessfenster für OrmoComp[®] bei einer Wellenlänge von 515 nm ist in Abbildung 4.4 dargestellt. Bei Laserleistungen innerhalb des Prozessfensters können nach der Belichtung der Linien und nach weiteren

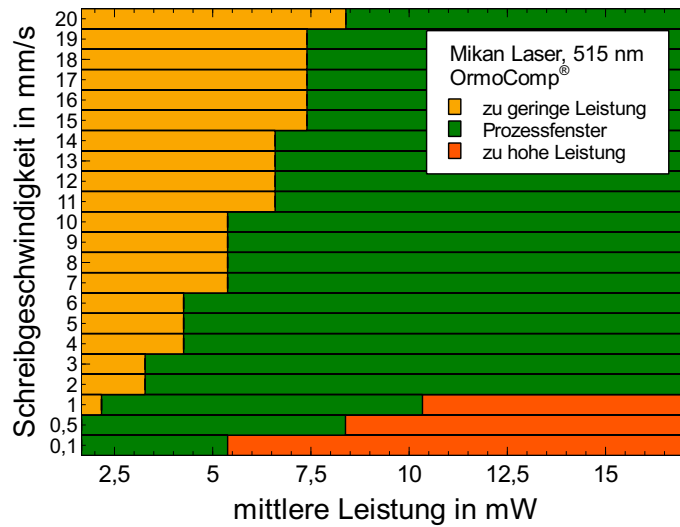


Abbildung 4.4: Prozessfenster für OrmoComp® ermittelt mit Teststruktur.

vom Material abhängigen Nachbehandlungsschritten mit einem Mikroskop in der Stützstruktur eingebettete Linien identifiziert werden. Die mittlere Laserleistung wird dabei für diskrete Leistungswerte mit einem Leistungsmessgerät nach dem Objektiv aufgenommen. Weitere Ergebnisse für die Hybridpolymere, welche aufgrund ihrer einfachen Handhabung und guten Ergebnisse bei der Anfertigung von Teststrukturen zu bevorzugen sind, sind in Anhang A.1 aufgeführt. Die mindestens benötigte Laserleistung, um bei Schreibgeschwindigkeiten von 0,1 – 20 mm/s und einer Wellenlänge von 515 nm in den Hybridpolymeren generierte Linien festzustellen, wird in Abbildung 4.5 gezeigt. Da sich die Belichtungszeit der Linien mit steigender Geschwindigkeit verkürzt, ist zu erwarten, dass die Laserleistung dementsprechend erhöht werden muss. Eine Abhängigkeit zwischen Schreibgeschwindigkeit und eingebrachter Leistung wird aus [27] hergeleitet. Für eine Zwei-Photonen-Polymerisation gilt

$$\bar{P}^2 \propto \frac{1}{t_{\text{Belichtung}}} \propto v, \quad (4.1)$$

wobei \bar{P} die mittlere Leistung, $t_{\text{Belichtung}}$ die Belichtungszeit des Materials an einem Punkt und v die Schreibgeschwindigkeit sind. Unter der Annahme, dass die nach dem Objektiv gemessene mittlere Leistung $\bar{P}_{\text{gemessen}}$ mit einer Leistungskorrektur \bar{P}_{korr} , z. B. aufgrund zusätzlich gemessenem Umgebungslicht und Reflexion an Grenzflächen, zu korrigieren ist, ergibt sich

$$\bar{P}^2 = (\bar{P}_{\text{gemessen}} - \bar{P}_{\text{korr}})^2 \propto v \quad (4.2)$$

und daraus die Funktion

$$\bar{P}_{\text{gemessen}} = a\sqrt{v} + \bar{P}_{\text{korr}} \quad (4.3)$$

mit einem Proportionalitätsfaktor a , welche in Abbildung 4.5 an die ermittelten Werte angepasst wurde und den Verlauf dieser Werte wiedergibt.

Bereits während des Herstellungsprozesses der Teststruktur mit dem 515 nm Ultrakurzpulslaser in IP-Dip wurde mit der im Aufbau integrierten CCD Kamera beobachtet,

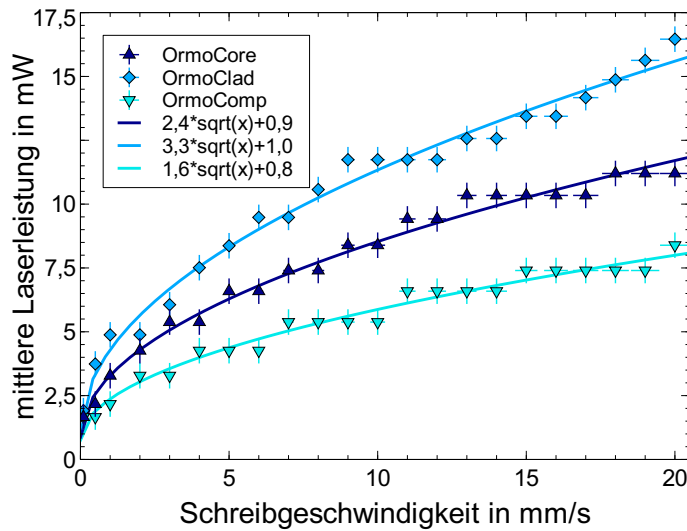


Abbildung 4.5: Mindestens benötigte Laserleistung bei einer Wellenlänge von 515 nm zum Erzeugen von mit einem Mikroskop sichtbaren Linien in den Hybridpolymeren.

dass sich das Material anders als die zuvor analysierten Materialien verhält und unkontrolliert polymerisiert. Nach der Nachbehandlung der belichteten Proben konnte die vorgegebene Form der Teststruktur nicht identifiziert werden. Weitere Untersuchungen mit anderen zwei- und dreidimensionalen Strukturen bestätigten dieses Verhalten und legen nahe, dass keine Zwei-Photonen-Polymerisation als primärer Prozess im Material stattfindet. Um mögliche Fehler in der Handhabung des Materials IP-Dip auszuschließen, wird die Teststruktur ebenfalls mit dem integrierten 780 nm Laser angefertigt, die empfohlene Wellenlänge für Zwei-Photonen-Polymerisation in IP-Dip. Diese Struktur sieht wie zu erwarten aus und wird in Abbildung 4.6 durch REM-Aufnahmen veranschaulicht. Am Rand der Teststruktur (siehe Abbildung 4.6 (a)), an welchem während des Schreibprozesses zum Wenden abgebremst und beschleunigt wird, sind keine sauberen Kanten vorhanden. Dies ist darin begründet, dass die Laserleistung während den Beschleunigungs- und Abbremsphasen nicht nachgeregelt wird und dies geht mit einer stärkeren Polymerisation des Materials einher.

Mehrere Versuche dreidimensionale Strukturen mit der 515 nm Lichtquelle in dem Positiv-Photoresist ma-P 1275 zu generieren scheiterten. Die zuvor aufgenommene Transmissionsmessung (siehe Abbildung 4.1) berücksichtigend führt dies zu der Annahme, dass bei einer Wellenlänge von 515 nm die Zwei-Photonen-Polymerisation nicht der dominierende Prozess ist. Anhand von Helices, welche mit dem integrierten 780 nm Ultrakurzpulslaser durchgängig in eine 30 μm dicke Schicht ma-P 1275 geschrieben wurden, konnte nachgewiesen werden, dass es mit dem verwendeten Aufbau möglich ist, dreidimensionale Strukturen bei 780 nm in diesem Material zu erzeugen.

Zusammenfassend wurden mehrere fotosensitive Materialien erfolgreich evaluiert und OrmoCore, OrmoClad, OrmoComp[®], SU-8 und E-Shell 600 als geeignete Kandidaten für Zwei-Photonen-Polymerisation bei 515 nm identifiziert. Darüber hinaus wurden Prozessfenster für diese Materialien bestimmt und optimiert. Die vorgestellte Methode zur Definition von passenden Leistungsbereichen für die Anfertigung

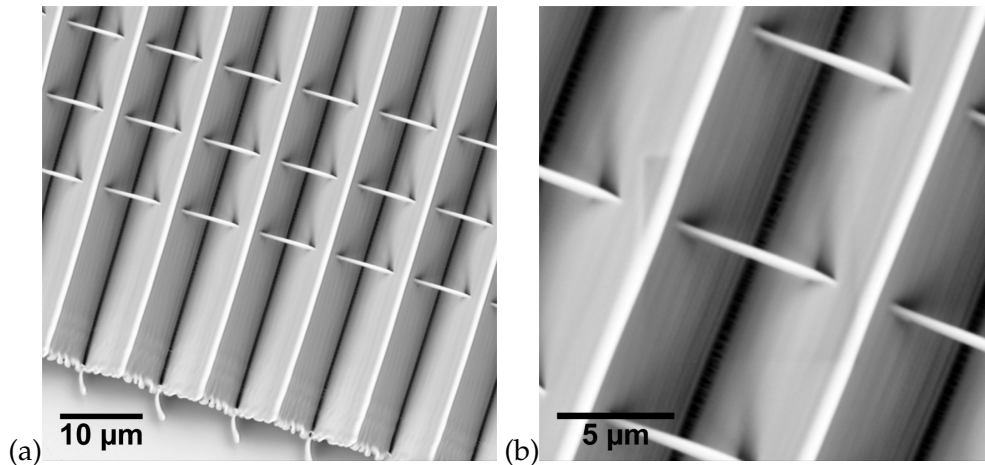


Abbildung 4.6: REM-Aufnahmen (a) vom Rand einer Teststruktur und (b) einem vergrößerten Ausschnitt in der Mitte hergestellt in IP-Dip mit einer Wellenlänge von 780 nm.

dreidimensionaler Strukturen mittels Zwei-Photonen-Absorption wurde an mehreren Materialien durchgeführt und eignet sich für die Analyse weiterer Materialien erneut.

4.1.3 Auflösungsgrenze von Strukturen aus OrmoComp[®]

Neben guten Ergebnissen bei der Herstellung von Strukturen zeichnet sich OrmoComp[®] durch Biokompatibilität [117, 118] und einfache Handhabung aus. Für dieses organisch-anorganische Hybridpolymer wird nun eine Auflösungsgrenze für das in Abschnitt 3.1 vorgestellte Bearbeitungssystem ermittelt. Zunächst werden Linien, die mit dem Substrat direkt verbunden sind, mit dem 515 nm Ultrakurzpulslaser in das Material geschrieben. Abhängig von den Prozessparametern wird eine minimale laterale Auflösung der Linien von 100 nm mit einem ZEISS EC Plan-Neofluar 100x Immersionsobjektiv erzielt.

Anschließend werden Linien zwischen zwei Gerüsten verankert (siehe Abbildung 4.7 (a)) und die Auflösung der freistehenden Linien analysiert. Auf diese Weise wird ein potenzieller Einfluss des Substrats auf die Auflösung vermieden. Für die feinste Linie in Abbildung 4.7 (b) wird eine laterale Linienbreite von (75 ± 25) nm ermittelt. Die gemessene Linienbreite ist somit feiner als die Herstellerspezifikation, welche eine Auflösung von bis zu 100 nm für OrmoComp[®] angibt. Bei den angefertigten Linien sind optimierte Prozessparameter (Schreibgeschwindigkeit von 0,1 mm/s und mittlere Laserleistung von 0,4 mW) und eine dünne Goldschicht von circa 5 nm zu berücksichtigen. Die Goldschicht wurde mit einem Hochvakuum-Beschichtungssystem⁸ für eine bessere Auflösung der Struktur unter dem Rasterelektronenmikroskop aufgetragen. Zudem ist anzumerken, dass die maximale Auflösung des verwendeten Rasterelektronenmikroskops⁹ (REM) im Bereich von 14 nm liegt.

⁸ Leica EM SCD500

⁹ Phenom Pro X

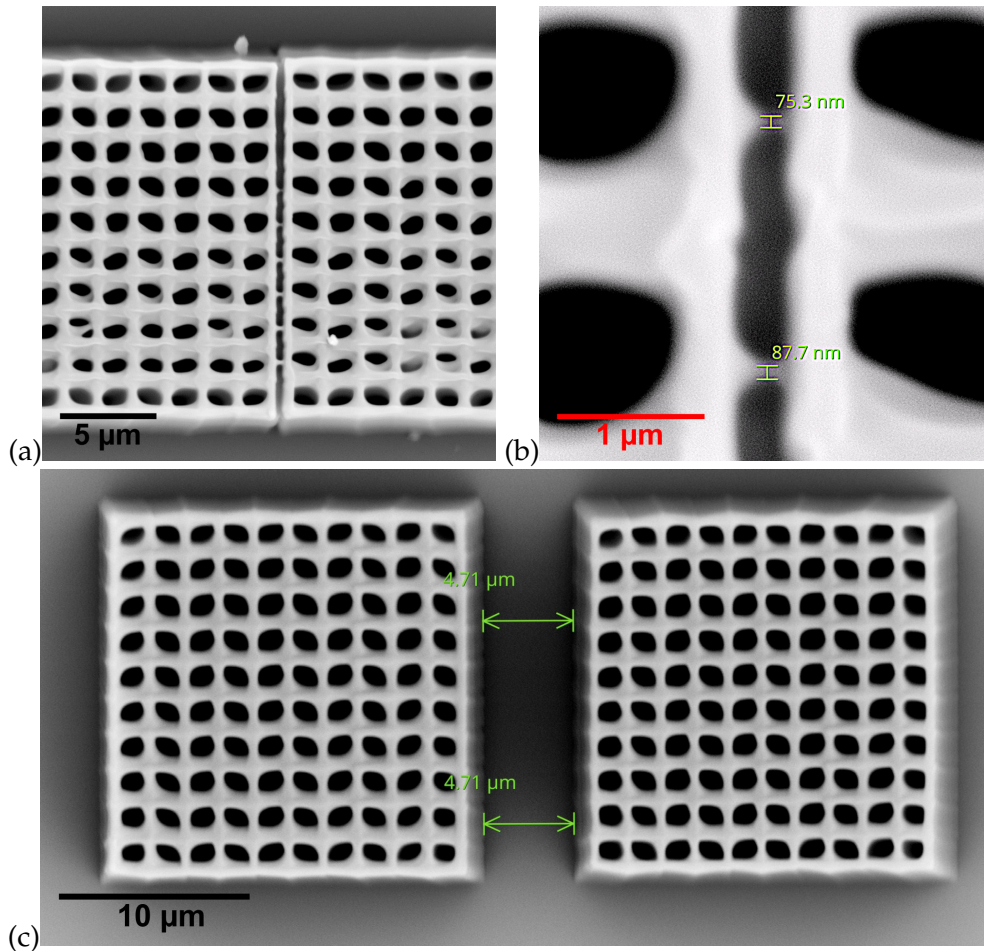


Abbildung 4.7: REM-Aufnahmen (a) von Linien verankert zwischen zwei Gerüsten, (b) einem vergrößerten Ausschnitt der feinsten Linien und (c) zwei Strukturen, wobei eine Sequenz aus drei Strukturen geschrieben wurde und die linke Struktur aus zwei am gleichen Ort generierten Strukturen besteht, die vor und nach der rechten Struktur geschrieben wurden.

Für eine präzise Anfertigung von dreidimensionalen Strukturen ist neben der Auflösung eines einzelnen Voxels oder einer einzelnen Linie auch die Genauigkeit des Nano-Positioniersystems von Bedeutung. Diese wird durch die Herstellung mehrerer Sequenzen von drei Strukturen getestet. Eine erste $20 \times 20 \times 20 \mu\text{m}$ Struktur wird auf dem Substrat platziert. Dann bewegt sich die x-Achse um $+25 \mu\text{m}$ und eine zweite $20 \times 20 \times 20 \mu\text{m}$ Struktur wird mit $5 \mu\text{m}$ Abstand gefertigt. Danach wird die x-Achse um $-25 \mu\text{m}$ bewegt und eine dritte $20 \times 20 \times 20 \mu\text{m}$ Struktur direkt auf der Position der ersten Struktur erzeugt. Abbildung 4.7 (c) zeigt eine der Sequenzen von drei Strukturen. Es sind zwei nahezu identische Strukturen mit hoher Genauigkeit zu sehen. Dies legt nahe, dass die beiden linken Strukturen an gleicher Stelle geschrieben sind. Die linke Struktur weist etwas weniger Schrumpfung als die rechte Struktur auf, was durch eine stärkere Vernetzung von Polymeren aufgrund der doppelten Belichtung erklärt werden kann. Der Abstand zwischen der linken und rechten Struktur wird an verschiedenen Stellen gemessen und weicht von $5 \mu\text{m}$ weniger als 300 nm ab. Alle erstellten Sequenzen

unterstreichen dieses Resultat mit vergleichbaren Ergebnissen und veranschaulichen, dass mit dem Nano-Positioniersystem eine Position mit einer Genauigkeit von 300 nm angefahren werden kann.

4.2 NICHTLINEARE ABSORPTIONSORDNUNG

Die nichtlineare Absorptionsordnung gibt an, wie viele Photonen bei einer nichtlinearen Anregung eines Materials absorbiert werden. Bei einer Zwei-Photonen-Absorption ist die Absorptionsordnung somit zwei. Für eine korrekte Bestimmung des Wirkungsquerschnitts und somit für eine detaillierte Untersuchung des Absorptionsverhaltens eines Materials ist es unabdingbar die nichtlineare Absorptionsordnung zu kennen [30, 119–123]. Durch Variation der Pulslänge und der Repetitionsrate wird im Folgenden die nichtlineare Absorptionsordnung der Hybridpolymere OrmoCore, OrmoClad und OrmoComp[®] bei einer Wellenlänge von 515 nm ermittelt. Grundlage für die hier vorgestellte Methode bilden die Veröffentlichungen von Müller et al. [28] zur Polymerisationskinetik und Colley et al. [124] zur Reaktivität von Photoinitiatoren.

4.2.1 Grundlagen

Wie bereits in Abschnitt 2.2.2 erklärt wurde, gibt es einen Belichtungsschwellwert, welcher erreicht werden muss, damit ein Material durch Zwei-Photonen-Absorption polymerisiert. Es sind somit Laserpulse mit einer ausreichend hohen Energie notwendig um genügend Radikale zum Starten der Polymerisation zu generieren. Diese mindestens geforderte Energie lässt sich bei verschiedenen Repetitionsraten und Pulslängen einer eingestrahlten Lichtquelle erzielen [125, 126]. Um jedoch keine weiteren, die Polymerisation beeinflussenden Effekte zu generieren, müssen die folgenden Randbedingungen erfüllt werden:

Die meisten Photoinitiatoren erzeugen Radikale mit einer zeitlichen Verzögerung von etwa 100 ps [124]. Die Repetitionszeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Laserpulsen sollte daher wesentlich größer sein als diese Reaktionsdauer, um eine Absorption des angeregten Zustands des Photoinitiators zu vermeiden. Die entstandenen Radikale bleiben von den einfallenden Laserpulsen unbeeinflusst, da sie das Laserlicht in der Regel nicht absorbieren.

Die Polymerisation im Material beginnt, abhängig vom Material, mit einer zeitlichen Verzögerung von 100 μ s oder länger. Die Belichtung des Materials an einem auszuhärtenden Punkt sollte in einer kürzeren Zeit erfolgen, da ansonsten eine zusätzliche Sauerstoffdiffusion und somit ein Abbau des Photoinitiators berücksichtigt werden muss [28].

In Fischer et al. [127] wird die Möglichkeit, die nichtlineare Absorptionsordnung durch Variation der Repetitionsrate zu bestimmen, anhand mehrerer fotosensitiver Materialien veranschaulicht. Dafür wurde die Pulsenergie am Belichtungsschwellwert in Abhängigkeit von der Repetitionsrate aufgenommen. Eine komplementäre Technik wird in Tomova et al. [128] präsentiert. Ein Laserstrahl wird in zwei un-

abhängige Teilstrahlen aufgeteilt. Anschließend werden die beiden Teilstrahlen mit zeitlich versetzten, sich nicht überlappenden Pulsen wieder überlagert und in das Material eingestrahlt. Durch Variation der Leistung wird für verschiedene Aufteilungen der Leistung zwischen den beiden Teilstrahlen der Belichtungsschwellwert für Zwei-Photonen-Polymerisation ermittelt. Aus der Abhängigkeit der normierten Laserleistung beider Teilstrahlen zueinander ergibt sich die Absorptionsordnung.

Die beschriebenen Randbedingungen und Techniken werden herangezogen um einen Zusammenhang zwischen Repetitionsrate, Pulslänge und Absorptionsordnung herzustellen. Der Belichtungsschwellwert zum Auslösen einer Polymerisation ist erreicht, wenn eine ausreichende kumulierte Belichtungs-dosis D_{kum} von N Photonen mit einer Belichtungs-dosis D_N in das Material eingetragen wurde. Daraus ergibt sich

$$D_{kum} = ND_N \propto f_{rep} \tau P_p^n \quad (4.4)$$

mit der Repetitionsrate f_{rep} , der Pulslänge τ , der Pulsleistung P_p und der Absorptionsordnung n . Für zwei Repetitionsraten f_a und f_b und Pulslängen τ_a und τ_b lässt sich somit ein vergleichbares Polymerisationsverhalten erzielen, wenn

$$f_a \tau_a P_a^n = f_b \tau_b P_b^n \quad (4.5)$$

gilt, wobei P_a und P_b passend gewählte Pulsleistungen sind. Stellt man diese Gleichung um, zeigt sich, dass die Absorptionsordnung der Steigung einer Geraden in einem doppel-logarithmischen Diagramm

$$\log \left(\frac{f_b \tau_b}{f_a \tau_a} \right) = -n \log \left(\frac{P_b}{P_a} \right) \quad (4.6)$$

entspricht.

4.2.2 Experimentelle Ergebnisse

Unter Berücksichtigung von Gleichung 4.6 wird die nichtlineare Absorptionsordnung von OrmoCore, OrmoClad und OrmoComp[®] bei einer Wellenlänge von 515 nm bestimmt. Hierfür wird die Repetitionsrate des zusätzlich eingebauten Lasers (siehe Abschnitt 3.3.2) zwischen 100 kHz und 10 MHz variiert. Die Repetitionszeit zwischen zwei Pulsen ist damit wesentlich größer als die Reaktionszeit zum Erzeugen von Radikalen von etwa 100 ps. Zudem wird der Laserstrahl während der Belichtung des Materials mit einer Schreibgeschwindigkeit von 1 mm/s oder 5 mm/s bewegt, sodass sich der Fokus in 100 μ s (zeitliche Verzögerung der Polymerisation) mindestens 100 nm weiter bewegt hat.

Für eine konstante Pulslänge von 420 fs wird eine Matrix von dreidimensionalen Gerüststrukturen mit von unten nach oben schrittweise ansteigender Repetitionsrate von 100 kHz bis 10 MHz und von links nach rechts steigender Laserleistung in die Materialien hineingeschrieben. Eine Matrix, welche in OrmoComp[®] generiert wurde, ist in Abbildung 4.8 dargestellt. Die Matrizen weisen für jede Repetitionsrate eine Leistung auf, die sich besonders gut zum Herstellen der Gerüststrukturen eignet und bei der die Gerüststrukturen aller Repetitionsraten eine vergleichbare Qualität haben. Diese Leistungen und die dazugehörige Repetitionsrate werden in einem doppel-logarithmischen Diagramm (siehe Abbildung 4.9) veranschaulicht. Die Anpassung

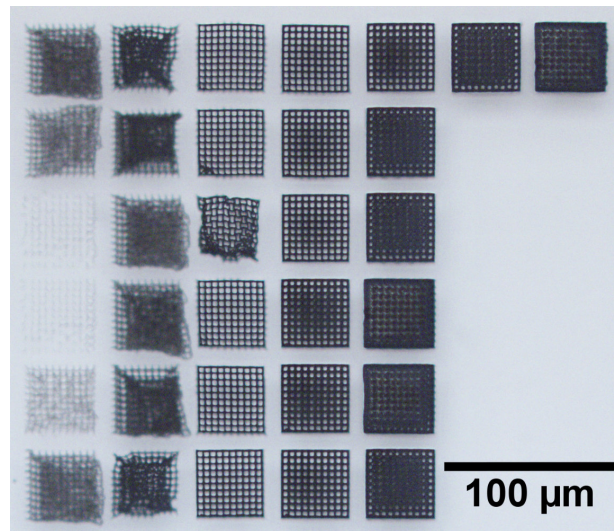


Abbildung 4.8: Leistungs-Repetitionsraten-Matrix von Gerüststrukturen mit von unten nach oben schrittweise ansteigender Repetitionsrate von 100 kHz bis 10 MHz und von links nach rechts steigender Laserleistung in OrmoComp®.

einer Geraden an die ermittelten Werte für die drei Hybridpolymere zeigt, dass jeweils eine nichtlineare Absorptionsordnung von zwei vorliegt. Die zusätzlichen Geraden mit einer Steigung von 1,5 und 2,5 deuten den Bereich an, in dem von Zwei-Photonen-Polymerisation auszugehen ist, und bis auf einen Wert liegen alle Messwerte in diesem Bereich.

In einer weiteren Untersuchung wird die Pulslänge bei konstanter Repetitionsrate variiert und überprüft, ob die Absorptionsordnung erneut ermittelt werden kann. Für eine konstante Repetitionsrate von 10 MHz wird in OrmoComp® eine Matrix von dreidimensionalen Gerüststrukturen eingebracht. Die Pulslänge wird von unten nach oben schrittweise von 345 fs auf 4,3 ps erhöht und von links nach rechts steigt die Laserleistung an. Für jede Pulslänge lässt sich eine Leistung identifizieren, die sich zum Anfertigen von vergleichbaren Gerüststrukturen bei unterschiedlichen Pulslängen eignet. In Abbildung 4.10 werden diese Leistungen und die dazugehörige Pulslänge in einer doppel-logarithmischen Darstellung präsentiert. Auch hier ergibt sich durch Anpassung einer Geraden an die Messwerte eine Steigung von zwei. Dies bestätigt das durch Änderung der Repetitionsraten erzielte Ergebnis einer Absorptionsordnung von zwei. Die Geraden mit einer Steigung von 1,5 und 2,5 kennzeichnen den Bereich, in dem Zwei-Photonen-Polymerisation angenommen werden kann.

In den Materialien OrmoCore und OrmoClad ist der Photoinitiator Irgacure 369 enthalten und in OrmoComp® der Photoinitiator Irgacure TPO. Die experimentellen Ergebnisse belegen, dass diese Photoinitiatoren bei einer Wellenlänge von 515 nm durch Zwei-Photonen-Absorption angeregt werden und eine Zwei-Photonen-Polymerisation in den Materialien stattfindet.

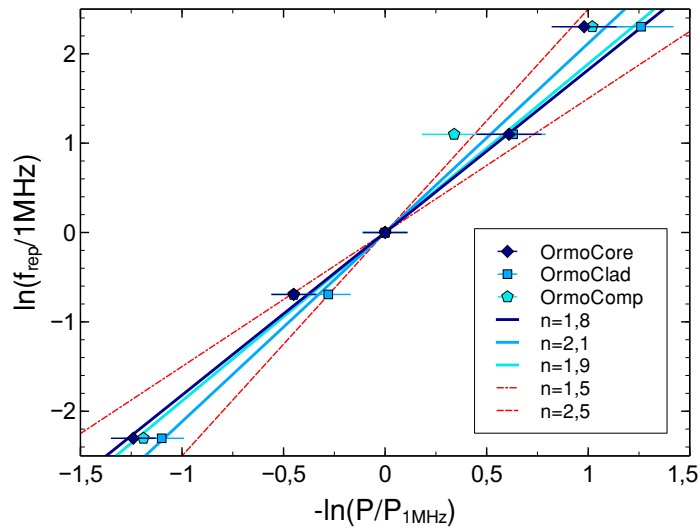


Abbildung 4.9: Doppel-logarithmische Darstellung von Leistungen zum Herstellen vergleichbarer Gerüststrukturen bei unterschiedlichen Repetitionsraten und Bestimmung der Absorptionsordnung durch Anpassen einer Geraden sowie zwei zusätzliche Geraden (gestrichelt) mit einer Steigung von 1,5 und 2,5 zur Veranschaulichung des Bereichs für Zwei-Photonen-Polymerisation.

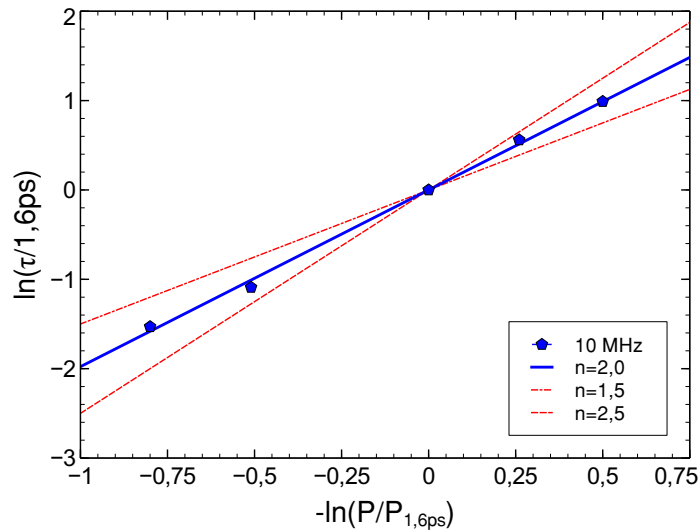


Abbildung 4.10: Doppel-logarithmische Darstellung von Leistungen zum Herstellen vergleichbarer Gerüststrukturen bei unterschiedlichen Pulslängen und Bestimmung der Absorptionsordnung durch Anpassen einer Geraden sowie zwei zusätzliche Geraden (gestrichelt) mit einer Steigung von 1,5 und 2,5 zur Veranschaulichung des Bereichs für Zwei-Photonen-Polymerisation.

4.3 PROZESSOPTIMIERUNG DURCH STRAHLMODULATION

Der Herstellungsprozess beim Laserdirekt schreiben ist im Vergleich zu anderen Fertigungsverfahren sehr zeitaufwändig. Durch gleichzeitiges Anfertigen mehrerer Strukturen mit mehreren Teilstrahlen ist es möglich den Prozess zu beschleunigen. Zur Strahlteilung eignen sich diffraktive optische Elemente [129, 130], Mikrolinsenarrays [131] und SLMs [132]. Im Vergleich zu diffraktiven optischen Elementen und Mikrolinsenarrays, welche für eine spezifische Modulation des Lichts hergestellt werden, kann bei einem SLM durch Variation der computergenerierten Hologramme auf dem Display die Modulation angepasst werden. Bei der Aufteilung eines Strahls in Teilstrahlen ist es für eine einheitliche Polymerisation wichtig, dass die Teilstrahlen eine gleiche Strahlform und Intensität haben. Die Arbeiten von Obata et al. [88] und Lin et al. [93, 133] zeigen, dass eine entsprechende Strahlteilung mit einem SLM realisiert werden kann. In [93] wird ein Array mit 200 Lichtpunkten präsentiert und damit Löcher in einem festen Polymer erzeugt.

Eine Belichtung des fotoempfindlichen Materials mit einer durch einen SLM gezielt modifizierten Intensitätsverteilung kann ebenfalls zu einer Zeitersparnis führen. Die Arbeiten von Yang et al. demonstrieren, dass sich mit einem ringförmigen Bessel-Strahl [21, 90] oder Vortex-Strahl [134] durch Polymerisation eines ringförmigen Volumens im Bereich der höchsten Intensität sehr effizient Mikroröhren durch Zwei-Photonen-Polymerisation fertigen lassen. Darüber hinaus kann durch eine Amplitudenmodulation von radial polarisiertem Licht die axiale Auflösung signifikant erhöht werden, wie die Ergebnisse von Lin et al. [89] belegen.

Aufgrund der dargelegten Einsparungen in der Produktionszeit und dem Potenzial die Auflösung weiter zu verbessern, wird ein SLM für eine effiziente und zeitsparende Herstellung von medizintechnischen Funktionselementen in das System integriert. Im Folgenden wird zunächst die Funktionsweise eines SLMs erklärt und auf einige Methoden zur Erstellung von Hologrammen eingegangen. Zudem wird anhand theoretischer Berechnungen zur Fokussierung mit kleiner und großer NA demonstriert, welchen Einfluss diese auf die Intensitätsverteilung haben kann. Abschließend wird durch eine Aufteilung des Laserstrahls in mehrere Teilstrahlen der korrekte Einbau und die Funktion des SLMs überprüft.

4.3.1 Funktionsweise eines räumlichen Lichtmodulators

Die meisten räumlichen Lichtmodulatoren besitzen entweder ein Mikrospiegelarray oder ein Flüssigkristalldisplay, mit welchem das auftreffende Licht moduliert wird [55, 135]. Dabei können die einzelnen Mikrospiegel und Flüssigkristallzellen (Pixel) einzeln in ihrer Ausrichtung verändert werden. Bei den Flüssigkristalldisplays wird zudem zwischen lichtdurchlässigen und reflektierenden Flüssigkristalldisplays unterschieden [136]. Für ein reflektierendes Flüssigkristalldisplay wird die Flüssigkristallschicht auf einen Silizium-Wafer aufgetragen. Dieser enthält zudem die Ansteuerung der einzelnen Pixel. Eine an die Pixel angelegte Spannung führt zu einem elektro-optischen Effekt und beeinflusst die Propagation von polarisiertem Licht durch eine anisotrope Flüssigkristallzelle. Dabei verändert die angelegte Spannung aufgrund der Anisotropie des Flüssigkristalls die Richtung der Moleküle im Flüssigkristall. Die optischen Eigenschaften des Materials sind ebenfalls von der Ausrichtung der Moleküle abhängig und daher

wird mit der angelegten Spannung auch der Brechungsindex des Flüssigkristalls modifiziert. Einer definierten Spannung kann somit eine bestimmte Graustufe zugeordnet werden, welche wiederum eine bestimmte Phasenverschiebung des Lichts aufgrund der Brechungsindexänderung hervorruft. Mit einem SLM kann die Amplitude, Phase oder Polarisation eines einfallenden Lichtstrahls räumlich und zeitlich verändert werden. [135, 137]

Für eine gezielte Modulation eines Lichtstrahls ist ein geeignetes Hologramm erforderlich, welches auf dem Display des SLMs dargestellt wird. Die Qualität der Modulation hängt jedoch nicht nur vom erstellten Hologramm sondern auch von dessen Wiedergabe durch den SLM ab [135, 137]. Die Auflösung des Hologramms wird durch die Anzahl, Größe und den Füllfaktor der Pixel begrenzt. Für eine korrekte Abbildung des Hologramms ist zudem entscheidend, dass die Graustufe eines Pixels im Hologramm der Phasenverschiebung durch den SLM entspricht. [138] Der Einfallswinkel des Lichts und die dadurch herbeigeführte Weglängenänderung in der Flüssigkristallzelle sind dabei ebenfalls zu berücksichtigen. Bei einer zeitlichen Variation der Modulation ist darüber hinaus relevant, wie schnell das Hologramm auf dem Display des SLMs verändert werden kann [139].

4.3.2 Methoden zur Generierung von Hologrammen

Für die Generierung eines Hologramms können verschiedene Methoden herangezogen werden [140–144]. Grundlage für die ersten beiden betrachteten Methoden ist, dass ein Lichtstrahl, welcher auf den SLM auftrifft, durch ein komplexes Feld U

$$U = a \exp(i\phi) \quad (4.7)$$

beschrieben werden kann. Dabei ist a die Amplitude des Felds und ϕ die Phase. Unter der Annahme, dass der SLM nur die Phase des einfallenden Lichts beeinflusst, ergibt sich für den Lichtstrahl nach dem SLM das komplexe Feld

$$U_h = a \exp[i(\phi + \phi_h)] \quad (4.8)$$

mit der durch das Hologramm erzeugten Phasenverschiebung ϕ_h . Der modulierte Strahl wird mit einem Objektiv in die Brennebene fokussiert und hat dort im Idealfall die gewünschte Intensitätsverteilung. Eine geeignete Phasenverschiebung ϕ_h kann mit einer der vorgestellten Methoden generiert werden.

Gitter und Linsen Methode

Die Gitter und Linsen Methode [144] nutzt die Phasenverschiebungen, welche bei einem Gitter oder einer Linse auftreten und ermöglicht damit eine laterale und axiale Verschiebung des fokussierten Laserstrahls und eine Aufteilung in mehrere unabhängige Foki. Für eine laterale Verschiebung des Fokus (Δx , Δy) ergibt sich eine Phasenverschiebung von

$$\phi_{\text{Gitter}}(x_h, y_h) = b (\Delta x x_h + \Delta y y_h), \quad (4.9)$$

wobei b von der Abbildungscharakteristik und Wellenlänge abhängt, und für eine axiale Verschiebung eine Phasenverschiebung von

$$\phi_{\text{Linse}}(x_h, y_h) = -\frac{k}{2f} (x_h^2 + y_h^2), \quad (4.10)$$

wobei f eine Funktion der Länge der axialen Verschiebung ist und k der Wellenvektor des Lichts. Die axiale Verschiebung ist äquivalent zu einer zusätzlichen Fokussierung mit einer Linse der Brennweite f . Eine axiale und laterale Verschiebung wird erzielt, wenn die beiden Phasenverschiebungen summiert werden. Für die durch das Hologramm hervorgerufene Phasenverschiebung wird der Modulo 2π der Summe

$$\phi_h = (\phi_{\text{Gitter}} + \phi_{\text{Linse}}) \mod 2\pi, \quad (4.11)$$

berechnet, da die durch einen SLM hervorgerufene Phasenverschiebung des Lichts begrenzt ist. Für die Aufteilung des einfallenden Lichtstrahls in mehrere Foki N werden die komplexen Felder $U_{h,n}$ der einzelnen Lichtstrahlen addiert. Das Argument der Superposition der komplexen Felder

$$\phi_h = \arg \left(\sum_{n=1}^N U_{h,n} \right) \quad (4.12)$$

liefert die Phasenverschiebung durch den SLM. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass dies nur eine Näherung ist, da die relativen Phasen und die Gewichtung der einzelnen Lichtstrahlen vernachlässigt werden [145].

Gerchberg-Saxton Methode

Eine weitere Methode zur Bestimmung eines geeigneten Hologramms für die Phasenmodulation ist die Gerchberg-Saxton Methode [140, 144]. Sie beruht darauf, dass für die Fokussierung des Strahls in die Brennebene die Fraunhofer-Näherung angenommen werden kann. Dadurch lässt sich die Beziehung zwischen dem komplexen Feld U_h erzeugt durch das Hologramm in der Hologramm-Ebene und dem komplexen Feld im Fokus des Objektivs in der Brennebene U_b durch eine Fourier-Transformation

$$U_b(x_b, y_b) = \mathcal{F} \{ U_h(x_h, y_h) \} \quad (4.13)$$

beschreiben. Die gewünschte Intensitätsverteilung in der Brennebene ergibt sich dann, wenn

$$I_b(x_b, y_b) = |U_b(x_b, y_b)|^2 = |\mathcal{F} \{ U_h(x_h, y_h) \}|^2. \quad (4.14)$$

Eine passende Phase ϕ_h , für die Gleichung 4.14 erfüllt wird, lässt sich iterativ bestimmen. Es wird hierfür zunächst mit einem komplexen Feld

$$U_{h,1} = \exp(i\phi_r) \quad (4.15)$$

mit einer zufälligen Phase ϕ_r und einer auf eins normierten Amplitude in der Hologramm-Ebene gestartet. Durch eine Fourier-Transformation ergibt sich für diese und alle weiteren l Iterationen das komplexe Feld

$$U_{b,l} = \mathcal{F} \{ U_{h,l} \} \quad (4.16)$$

in der Brennebene. Bei diesem wird nun die Amplitude der gewünschten Intensität entsprechend angepasst,

$$U_{b,l^*} = \sqrt{I_b} \exp(i\phi_{b,l}) \text{ mit } \phi_{b,l} = \arg(U_{b,l}), \quad (4.17)$$

und dieses modifizierte Feld durch eine inverse Fourier-Transformation zurück in die Hologramm-Ebene transformiert.

$$U_{h,l^*} = \mathcal{F}^{-1} \{U_{b,l^*}\} \quad (4.18)$$

Dann wird die Amplitude des komplexen Feldes in der Hologramm-Ebene wieder auf eins normiert,

$$U_{h,l+1} = \exp(i\phi_{h,l+1}) \text{ mit } \phi_{h,l+1} = \arg(U_{h,l^*}), \quad (4.19)$$

bevor eine weitere Fourier-Transformation in die Brennebene vorgenommen wird. Nach einigen Iterationen sollte die Phase des komplexen Feldes in der Hologramm-Ebene dazu in der Lage sein die gewünschte Intensitätsverteilung in der Brennebene zu generieren.

Debye-Theorie basierte Methode

Bei Objektiven mit hoher NA ist, wie bereits in Abschnitt 2.2.1 erklärt wurde, die paraxiale Näherung nicht länger geeignet. Die Debye-Theorie scheint hingegen eine geeignete Methode zu sein um die Intensitätsverteilung und Phaseninformation in der Fokusebene eines Objektivs mit hoher NA zu bestimmen. Dies wird bei der Debye-Theorie basierten Methoden, welche in [20, 93] beschrieben wird, berücksichtigt. Im Gegensatz zur Gerchberg-Saxton Methode wird für die Berechnung der Intensitätsverteilung I_b und der Phaseninformation ϕ_b in der Brennebene aus der Phasenverteilung ϕ_p der Pupillenfunktion $P(r) = A(r) \exp(i\phi_p)$ auf der rückseitigen Apertur die Debye-Theorie verwendet. Die Iteration zur Bestimmung der Phasenverteilung ϕ_p beinhaltet folgende Schritte. Zunächst wird die Intensität und Phase in der Brennebene durch die Debye-Theorie bestimmt,

$$P(r) = A(r) \exp(i\phi_p) \xrightarrow{\text{Debye-Theorie}} I_{b,1} = |E_x|^2 + |E_y|^2 + |E_z|^2, \phi_{b,1}. \quad (4.20)$$

Daraufhin wird eine Korrektur an der Intensitätsverteilung $I_{b,1}$ hin zur gewünschten Intensitätsverteilung I_b vorgenommen. Mit der korrigierten Intensitätsverteilung $I_{b,1}^*$ wird das komplexe Feld modifiziert und durch eine inverse Fourier-Transformation, die eine einfache Rücktransformation ermöglicht, zurück auf die Ebene der rückseitigen Apertur gebracht,

$$E_{b,1}^* = I_{b,1}^* \exp(i\phi_{b,1}) \xrightarrow{\text{inverse Fourier-Transformation}} E_{p,1}^*, \phi_{p,1}. \quad (4.21)$$

Die dabei erhaltene Phase $\phi_{p,1}$ wird anschließend in die Pupillenfunktion eingesetzt und die Berechnung solange wiederholt bis die gewünschte Intensitätsverteilung in der Brennebene erzielt wird.

4.3.3 Strahlmodulation

Für das Laserdirektschreiben werden verschiedene Objektive mit unterschiedlicher NA eingesetzt. Zunächst wird die Fokussierung durch diese Objektive genauer untersucht, bevor der Eingangsstrahl vor dem Objektiv zusätzlich mit Hilfe eines SLMs moduliert wird. Die NA des ZEISS LD Plan-Neofluar 63x Objektivs mit einer NA von 0,75 und des ZEISS EC Plan-Neofluar 100x Objektivs mit einer NA von 1,3 sind in einem

Bereich, in dem die Intensitätsverteilung im Fokus besser durch die Debye-Theorie als durch eine paraxiale Näherung beschrieben wird. Theoretische Berechnungen zur Intensitätsverteilung zeigen, wie eine hohe NA und die Polarisierung des Lichtstrahls diese im Bereich des Fokus beeinflussen. Grundlage hierfür bildet die in Abschnitt 2.2.1 eingeführte Debye-Theorie. Als Eingangsstrahl wird jeweils eine homogene ebene Welle und eine kreisförmige Linsenapertur angenommen.

In Abbildung 4.11 ist die berechnete Intensitätsverteilung in der x-y-Ebene senkrecht zum Laserstrahl bei einer NA von 0,5 und eine NA von 1,3 für eine eingestrahlte Wellenlänge von 515 nm und einen Brechungsindex des Mediums, in das fokussiert wird, von 1,5 dargestellt. Neben einem linear und zirkular polarisierten Eingangsstrahl wird ein Vortex-Strahl mit einem spiralförmigen Phasenprofil und einer Singularität im Zentrum betrachtet. Eine solche Phasenverschiebung kann unter anderem mit einem SLM erzeugt werden. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei einer linearen Polarisierung (siehe Abbildungen 4.11 (a-d)) der fokussierte Strahl bei einer höheren NA aufgrund der stärkeren Depolarisation entlang der Polarisationsachse gestreckt wird. Im Vergleich dazu bleibt bei einem zirkular polarisierten Eingangsstrahl die kreisförmige Intensitätsverteilung auch bei hoher NA erhalten, wie die Abbildungen 4.11 (e-h) zeigen. Die Betragsquadrate der einzelnen Feldkomponenten für linear und zirkular polarisiertes Licht sind in Anhang A.3 abgebildet und veranschaulichen detailliert den Unterschied der Felder und ihres Anteils bei kleinerer und größerer NA.

Eine ringförmige Intensitätsverteilung ließ sich mit einer spiralförmigen Phasenmodulation durch den SLM generieren und mit einer CCD Kamera der Unterschied zwischen dem fokussierten Strahl mit und ohne Phasenmodulation beobachten (siehe Abbildung 4.12). Diese Strahlformung kann, wie in [134] demonstriert wird, zur effizienten Herstellung von Mikroröhren dienen. In [133] wird darüber hinaus präsentiert, dass sich durch die Verwendung von drei überlagerten, aber zueinander versetzten Vortex-Phasenprofilen spiralförmige Intensitätsverteilungen realisieren lassen.

Zusätzlich zur Strahlformung durch eine spiralförmige Phasenmodulation werden erste Ergebnisse bei der Strahlaufteilung in mehrere Teilstrahlen erzielt. Dafür werden die von der Software des SLMs bereitgestellten Hologramme für binäre Strahlteiler mit einer Aufteilung in 2×2 Teilstrahlen und in 5×5 Teilstrahlen mit einem Beugungsgitter überlagert und die erste Beugungsordnung des Beugungsgitters verwendet. Abbildung 4.13 zeigt die mit einer CCD Kamera aufgenommenen Brennpunkte der einzelnen Spots. Anschließend werden die modulierten Strahlen mit einem ZEISS LD Plan-Neofluar 63x Objektiv in OrmoComp[®] fokussiert und Teststrukturen erstellt. Die durch die einzelnen Foki ausgehärteten Strukturen weisen eine unterschiedlich starke Polymerisation auf. Dies weist darauf hin, dass die Intensität der einzelnen Strahlen in einem iterativen Verfahren aufeinander angepasst werden muss. Die präsentierten Methoden zur Generierung eines Hologramms bieten für diesen nächsten Schritt eine gute Grundlage.

4.4 ZUSAMMENFASSUNG

Das Polymerisationsverhalten verschiedener Materialien wurde bei einer Wellenlänge von 515 nm untersucht und dabei festgestellt, dass nicht alle Materialien das für eine Zwei-Photonen-Polymerisation typische Verhalten zeigen. Die Hybridpolymere Ormo-Core, OrmoClad und OrmoComp[®] werden aufgrund ihrer einfachen Handhabung

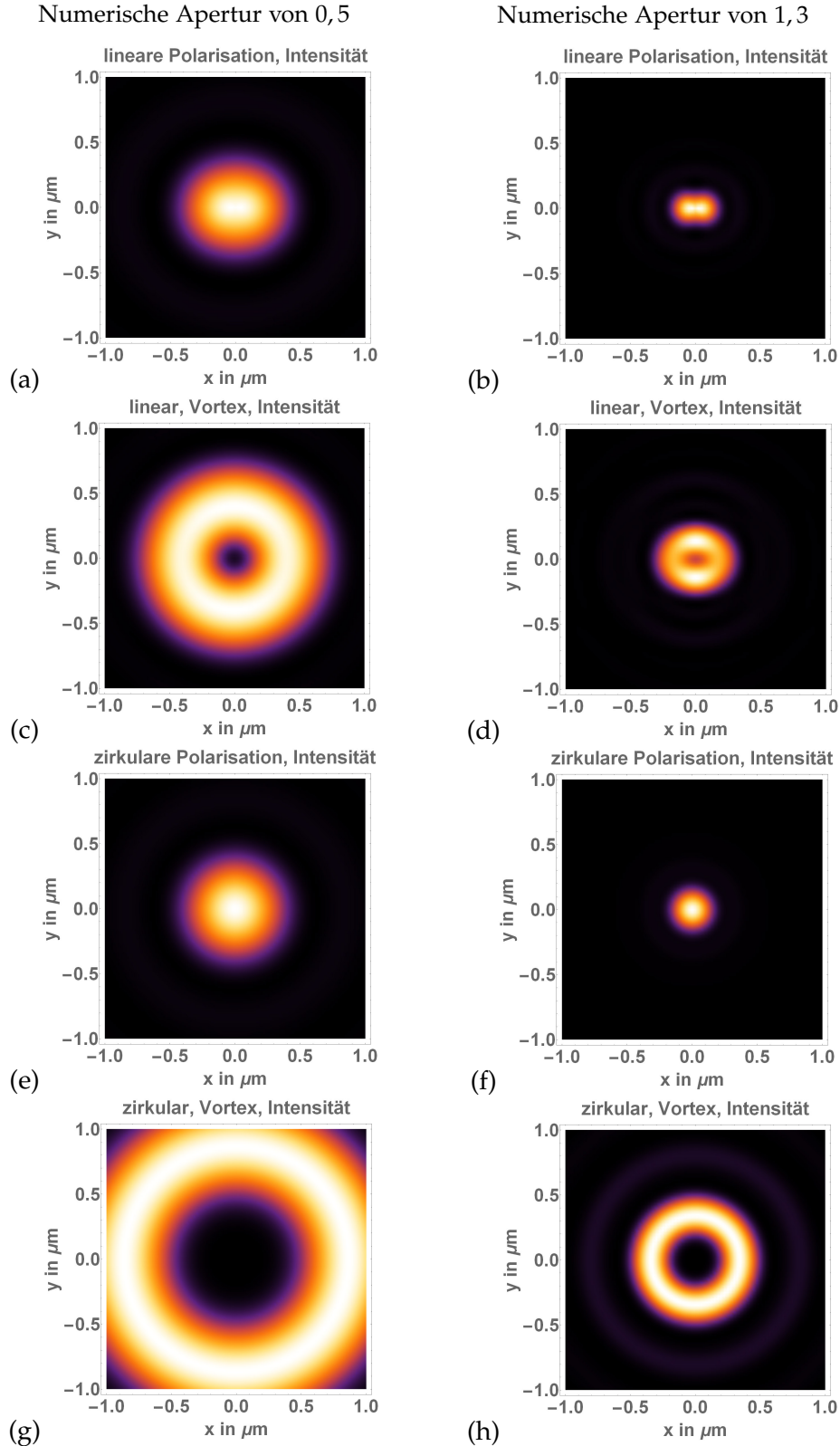


Abbildung 4.11: Intensitätsverteilung im Bereich des Fokus eines linear (a, b) und zirkular (e, f) polarisierten Eingangsstrahls und Vortex-Strahls (c, d, g, h) für eine eingestrahle Wellenlänge von 515 nm und einen Brechungsindex des Mediums, in das fokussiert wird, von 1,5.

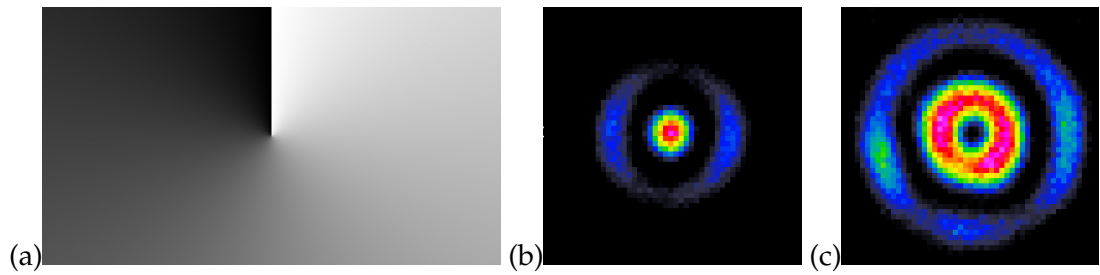


Abbildung 4.12: (a) Hologramm für spiralförmige Phasenmodulation und Intensitätsverteilung im Fokus (b) ohne und (c) mit Phasenmodulation.

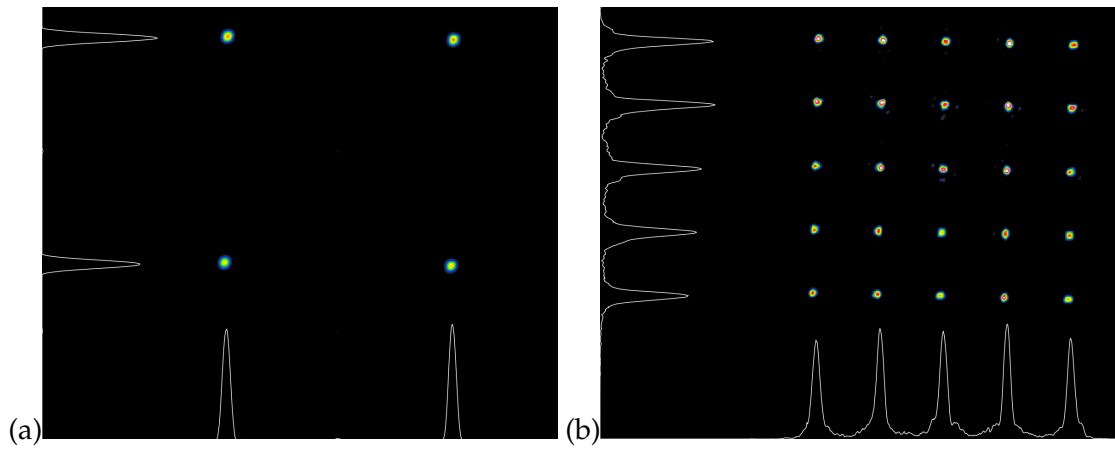


Abbildung 4.13: Strahlaufteilung in (a) 2×2 Teilstrahlen und (b) 5×5 Teilstrahlen erzeugt unter Verwendung des SLMs.

und guten Ergebnisse bei der Anfertigung von Teststrukturen für die Herstellung von medizintechnischen Funktionselementen verwendet. Für diese wurde zudem bei einer Wellenlänge von 515 nm die Absorptionsordnung durch Variation der Repetitionsrate und Pulslänge bestimmt. Alle drei Materialien absorbieren das Licht mit einer Absorptionsordnung von zwei. Abschließend wurde auf die Prozessoptimierung durch Strahlmodulation eingegangen. Dabei wurde die Funktionsweise eines SLMs erklärt und verschiedene Methoden zur Generierung von Hologrammen diskutiert. Durch theoretische Berechnungen wurde aufgezeigt, welchen Einfluss bereits eine hohe NA und die Polarisierung des Strahls bei der Fokussierung auf die Intensitätsverteilung haben. Erste Strahlformungen und Strahlaufteilungen sind eine Motivation für zukünftige Anwendungen des SLMs für eine weitere Optimierung der Herstellung von medizintechnischen Funktionselementen, wie Gerüststrukturen für ein kontrolliertes Wachstum von Zellen hin zur Gewebezüchtung.

GERÜSTSTRUKTUREN FÜR ZELLSTUDIEN MIT HUMANEN FIBROBLASTEN

Das Wachstumsverhalten von Zellen wird durch ihre direkte Umgebung beeinflusst. Der genaue Einfluss unterschiedlicher Faktoren ist jedoch nicht vollständig verstanden und Teil aktueller Forschung. Neben besonderen Voraussetzungen, die notwendig sind um die zellularen Funktionen aufrecht zu erhalten [11], gibt es weitere Faktoren, welche Auswirkung auf die Adhäsion, Ausrichtung, Migration und Proliferation von Zellen haben [9, 10, 146]. Um eine ideale und kontrollierbare Umgebung für Zellen zu schaffen, sind dreidimensionale reproduzierbare Gerüststrukturen, die oft Scaffolds genannt werden, mit filigraner Ausarbeitung ein vielversprechender Ansatz. Laserdirektschreiben mittels Zwei-Photonen-Absorption ist eine prädestinierte Methode um solche dreidimensionale Scaffolds anzufertigen, da durch die präzise Modifizierung eines fotoempfindlichen Materials beliebige Strukturen mit einer hohen Auflösung im Submikrometerbereich erzeugt werden können [3, 147, 148].

Im Folgenden wird eine Single-line single-pass Technik vorgestellt, mit welcher eine signifikante Zeitersparnis bei der Herstellung makroskopischer Gerüststrukturen mit unterschiedlicher Porengröße erzielt werden konnte. Zudem wird das Wachstumsverhalten von Fibroblasten an Strukturen aus OrmoComp[®] untersucht und hierbei auf die Punkte Toxizität der Strukturen, Zelladhäsion und Zellproliferation eingegangen. Es wird gezeigt, dass große Gerüststrukturen aus OrmoComp[®] aufgrund des beobachteten vertikalen und horizontalen Wachstums der Zellen ein vielversprechendes Potenzial für weiterführende Zellwachstumsstudien direkt an der Struktur ohne zusätzliche unterstützende Proteinbeschichtungen haben.

5.1 DESIGN UND HERSTELLUNG VON GERÜSTSTRUKTUREN

Obwohl die Zwei-Photonen-Absorption bereits 1929 von Maria Göppert-Mayer theoretisch beschrieben wurde [12], ist es immer noch eine Herausforderung makroskopische Objekte mit diesem Prozess, welcher Material gezielt punktuell mit nanoskaliger Auflösung aushärtet, anzufertigen. Die Herstellung einzelner Objekte mit einer Größe im Millimeterbereich dauert in der Regel mehrere Stunden oder sogar Tage [149–152]. Ein Ansatz um die Produktionszeit zu reduzieren besteht darin mehrere Bereiche eines Objekts oder mehrere Objekte gleichzeitig durch mehrere Teilstrahlen zu generieren [88, 92, 153]. Des Weiteren bietet ein Wechsel des Objektives und die damit verbundene Veränderung der Intensitätsverteilung im Fokus den Vorteil die Voxelgröße zu variieren und somit die Auflösung für unterschiedliche Bereiche anzupassen [148, 154]. Dies führt zu einer schnelleren Anfertigung von Teilbereichen mit geringerer Auflösung.

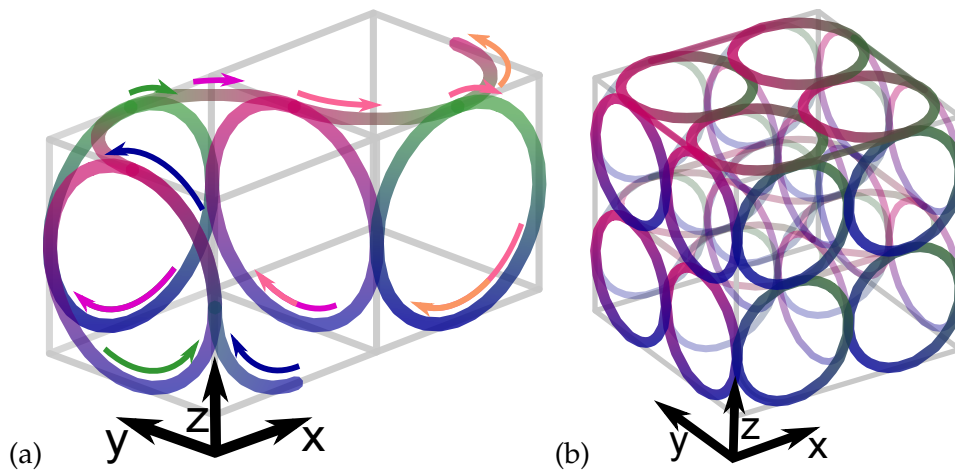


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung (a) der Verkettung von Ellipsen zu einer geschlossenen Kurve zur Herstellung einer Gerüststruktur und (b) Aufbau einer Gerüststruktur mit acht Poren.

Die beiden vorgestellten Optimierungsmöglichkeiten gehen jedoch mit einer Erweiterung des Aufbaus für Zwei-Photonen-Polymerisation um zusätzliche optische und mechanische Komponenten einher.

5.1.1 *Single-line single-pass Schreibtechnik*

Durch die Entwicklung einer ununterbrochenen Single-line single-pass Schreibtechnik ist es gelungen bereits mit dem Standardaufbau für Zwei-Photonen-Polymerisation die Produktionszeit für Gerüststrukturen signifikant zu verringern. Dieser Technik liegt eine Optimierung des zurückgelegten Verfahrenswegs der Achsen während des Schreibprozesses zugrunde und sie geht einher mit einem speziellen Design der Gerüststrukturen, welches den Vorteil des tatsächlichen dreidimensionalen Anfertigungs von Strukturen nutzt. Im Vergleich zu den meisten bisherigen Arbeiten [11, 35, 149–151, 155] wird hierbei nicht an einer Schicht für Schicht Herstellung oder einer Woodpile-Struktur festgehalten. Eine vollständige Gerüststruktur ist aus einer einzigen Kurve aufgebaut, die während der Herstellung der Struktur mit dem Fokus des eingestrahlten Lasers abgefahren wird. Die Kurve ist durchgehend und jede Position mit Ausnahme von Kreuzungspunkten wird nur einmal abgefahren.

Der Aufbau einer Struktur mit dieser Single-line single-pass Technik wird in Abbildung 5.1 veranschaulicht. Eine Struktur wird zunächst aus mehreren Quadern aufgebaut, deren Kantenlängen die Porengröße festlegen. Anschließend wird die Gerüststruktur selbst entwickelt, indem in die Seitenflächen der Quader Ellipsen gelegt werden, deren Haupt- und Nebenachse der Kantenlängen des Quaders entsprechen. Die einzelnen Ellipsen werden so verbunden, dass sie in einem ununterbrochenen Prozess als geschlossene Kurve abgefahren werden können. Ein Ausschnitt einer solchen Verkettung von Ellipsen zu einer Kurve ist in Abbildung 5.1 (a) dargestellt. Abbildung 5.1 (b) zeigt zudem den Aufbau eines Gerüsts mit acht runden Poren.

5.1.2 Laserdirektschreiben von Gerüststrukturen

Zur Herstellung solcher Strukturen für Zellwachstumsuntersuchungen wird der in Abschnitt 3.1 vorgestellte Aufbau mit 515 nm Ultrakurzpulslaser verwendet. Für kleinere Porengrößen von 5 μm bis 25 μm wird ein ZEISS LD Plan Neofluar 63x Objektiv mit einer NA von 0,75 und für größere Poren von 25 μm bis 100 μm wird ein ZEISS EC Epiplan Neofluar 20x Objektiv mit einer NA von 0,5 eingesetzt. Diese unterschiedlichen Porengrößen werden gewählt, da die Porengröße und Porenform das Wachstumsverhalten von Zellen beeinflusst [156]. Für Fibroblasten, welche in den Zellwachstumsversuchen Anwendung finden, wurde in anderen Arbeiten eine optimale Porengröße von 20 μm identifiziert und allgemein wird eine Größe der Poren doppelt so groß wie der Durchmesser einer einzelnen Zelle empfohlen [157].

Dreidimensionale Gerüste mit entsprechenden Poren werden in eine Schicht aus OrmoComp[®] geschrieben, welche in einer Schichtanordnung zwischen zwei Deckgläsern mit Abstandshaltern aufgetragen wird. Dieses organisch-anorganische Hybridpolymer wird gewählt, da es über eine hohe chemische und thermische Stabilität verfügt [158] und mechanische Eigenschaften ähnlich derer von Knochen aufweist [10]. Zudem wurde von mehreren Gruppen die Biokompatibilität dieses Materials anhand der Aussaat von Zellen auf mit OrmoComp[®] beschichteten Deckgläsern [10, 158] und der erfolgreichen Verwendung für Untersuchungen an Zellkulturen [77, 159] gezeigt. Weitere Studien mit Ormoceren demonstrierten überdies in vitro und in vivo Biokompatibilität von Hybridpolymeren [36, 160]. Somit scheint OrmoComp[®] ein vielversprechender Kandidat für biomedizinische Anwendungen zu sein. Die Scaffolds werden verankert mit dem unteren Deckglas in diesem fotoempfindlichen Material generiert. Anschließend durchlaufen die noch von unausgehärtetem Restmaterial umgebenen Gerüststrukturen mehrere Nachbehandlungsschritte.

Es wurden Strukturen mit unterschiedlichen Porengrößen von 5 μm bis 100 μm konstruiert und mit der Single-line single-pass Schreibtechnik angefertigt. Dabei ist es möglich, Scaffolds mit einer für Zwei-Photonen-Polymerisation enormen Oberfläche der Oberseite von mehr als 9 mm² zu realisieren. Eine dieser Strukturen wird in Abbildung 5.2 (a) präsentiert. Dies geht über den notwendigen Bereich von 1 mm² für Proof-of-Principle-Studien zu zellularem Verhalten an durch zwei Photonen polymerisierten Scaffolds hinaus [11]. Zur besseren Veranschaulichung des Aufbaus der dreidimensionalen Strukturen für Zellwachstumsuntersuchungen wird in Abbildung 5.2 (b) eine REM-Aufnahme eines Teils einer Gerüststruktur mit 10 μm Porengröße gezeigt. Die Seitenwände sind aufgrund der unterschiedlich starken Polymerisation in lateraler und axialer Richtung, welche durch die Intensitätsverteilung im Bereich des Fokus während der Herstellung bedingt wird, geschlossen. Dieses Aspektverhältnis ist durch weitere optische Komponenten und Veränderung der Intensitätsverteilung im Bereich des Fokus anpassbar, so dass die Seitenwände geöffnet werden können.

5.2 EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE DER ZELLSTUDIEN

Bei den ersten Versuchen primäre, humane, dermale Fibroblasten¹, im Bindegewebe vorkommende Zellen, auf den Gerüststrukturen wachsen zu lassen war vor allem bei

¹ Cat.: FC-0024

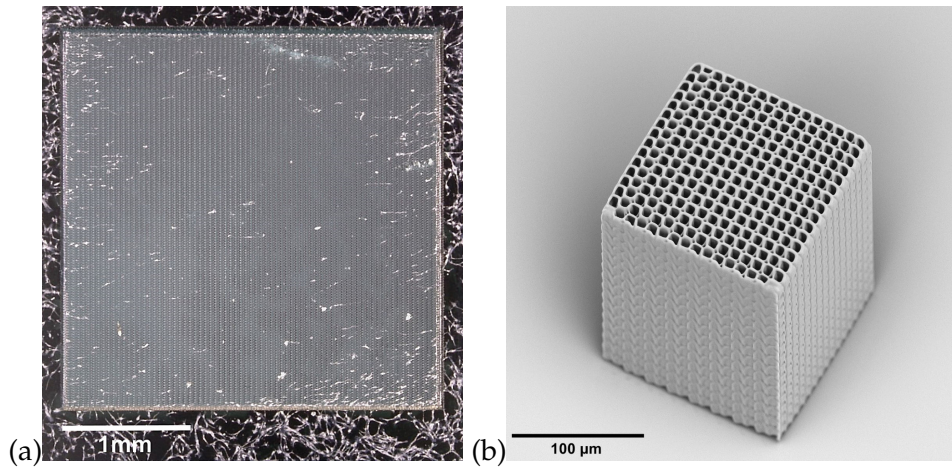


Abbildung 5.2: (a) Mikroskopaufnahme einer Gerüststruktur und (b) REM-Aufnahme eines Teils einer Gerüststruktur mit 10 µm Porengröße.

Porengröße	Gesamtvolumen	Geschwindigkeit	Leistung	Objektiv
5 µm	3 × 3 × 0,015 mm ³	3,5 mm/s	7 mW	63 x
15 µm	3 × 3 × 0,045 mm ³	5 mm/s	12 mW	63 x
20 µm	3 × 3 × 0,060 mm ³	5 mm/s	13 mW	63 x
25 µm	3 × 3 × 0,125 mm ³	5 mm/s	19 mW	20 x
35 µm	3 × 3 × 0,105 mm ³	2 mm/s	21 mW	20 x
50 µm	3 × 3 × 0,150 mm ³	1,5 mm/s	21 mW	20 x
60 µm	3 × 3 × 0,180 mm ³	1 mm/s	21 mW	20 x

Tabelle 5.1: Parameter zur Anfertigung von Gerüststrukturen der Versuchsreihe 1.

größeren Porengrößen eine Toxizität des Materials zu beobachten. Durch systematisches Verändern der Nachbehandlungsschritte nach dem Herstellen der Strukturen konnte die toxische Wirkung auf die Zellen überwunden werden und es war eine Proliferation der Fibroblasten auf und in den Strukturen möglich.

5.2.1 Toxizität des Materials

Im Laufe von fünf Versuchsreihen wird ein Nachbehandlungsprozess identifiziert, mit welchem keine Toxizität der Gerüststrukturen auf die Zellen mehr auftritt.

Versuchsreihe 1

Für die ersten Versuche Fibroblasten an mit Zwei-Photonen-Polymerisation gefertigte Scaffolds anwachsen zu lassen werden Gerüste aus OrmoComp[®] mit den in Tabelle 5.1 angegebenen Parametern auf Deckgläsern angefertigt. Beim Design der Strukturen wird eine gleiche Kantenlänge in allen drei Raumrichtungen gewählt, so dass diese aus Kreisen aufgebaut sind. Die resultierenden Gerüststrukturen nach dem Schreibprozess

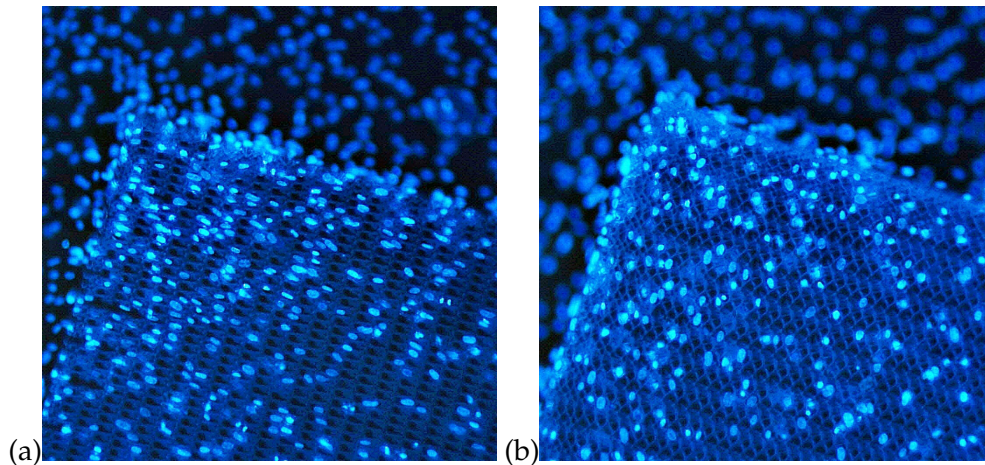


Abbildung 5.3: Mikroskopische Beurteilung der fluoreszierenden Zellkerne von Proben mit (a) 15 µm Porengröße und (b) 20 µm Porengröße.

weisen jedoch nicht immer eine Kreisstruktur auf, da vor allem bei kleineren Porengrößen das ständige Beschleunigen und Abbremsen aufgrund der Richtungsänderung zu einer sichtbaren Abweichung zwischen definierter und tatsächlicher Position der beweglichen Achsen während des Prozesses führt. Aufgrund der langen Schreibdauer von bis zu 6 Stunden pro Scaffold für kleine Porengrößen wird jedoch auf eine Reduzierung der Geschwindigkeit verzichtet. Die auf diese Weise gefertigten stabilen, periodischen und reproduzierbaren Scaffolds werden nach der Processing Guideline für OrmoComp[®] nachbehandelt. Dazu werden sie zunächst im Entwickler OrmoDev gereinigt bis optisch keine Rückstände des nicht polymerisierten OrmoComp[®] mehr zu sehen sind. Danach werden die Proben mit Isopropanol gereinigt. Abschließend werden die Gerüststrukturen für 3 Stunden bei 150 °C auf einer Heizplatte ausgebacken.

Nach einer Dampfsterilisation (121 °C, 20 min) werden humane Fibroblasten mit einer Einsaatdichte von 20 000 Zellen/cm² auf den Proben platziert. Dieser Zelltyp wird verwendet, da Fibroblasten ein relativ schnelles Zellwachstum aufzeigen und eine konfluente Monoschicht innerhalb weniger Tage nach Aussaat erreicht werden kann. Eine lichtmikroskopische Beurteilung der Zellmorphologie nach Aussaat zeigt bei den Porengrößen von 5 µm bis 20 µm keine Auffälligkeiten, jedoch bei den größeren Poren eine Toxizität des Materials auf die Zellen. Aufgrund des größeren Gesamtvolumens und der stärkeren Tiefe der Prüfkörper mit großen Poren wird angenommen, dass entweder die größere Menge an ausgehärtetem Material oder Rückstände von nicht polymerisiertem Material toxisch wirken. Diese Beobachtungen decken sich mit einer Beurteilung der Zelladhäsion an Tag drei nach Aussaat. Dazu werden die Zellen gewaschen, fixiert und die Zellkerne mit DAPI-Farbstoff (1 µg/ml, 15 min, 4-8 °C) eingefärbt, um die Dichte der fluoreszierenden Zellkerne mikroskopisch zu beurteilen. In Abbildung 5.3 werden Aufnahmen einer Probe mit 15 µm Porengröße und 20 µm Porengröße gezeigt. Die Zellen adhärieren an Strukturen bis zu einer Porengröße von 20 µm immer weniger und ab 25 µm nicht mehr. Grundsätzlich haften die Fibroblasten auch sehr gut an dem Glassubstrat, auf welchem die Gerüste stehen.

Porengröße	Gesamtvolumen	Geschwindigkeit	Leistung	Objektiv
5 μm	$3 \times 3 \times 0,015 \text{ mm}^3$	3,5 mm/s	7 mW	63 x
10 μm	$3 \times 3 \times 0,050 \text{ mm}^3$	5 mm/s	13 mW	63 x
15 μm	$3 \times 3 \times 0,045 \text{ mm}^3$	5 mm/s	12 mW	63 x
20 μm	$3 \times 3 \times 0,060 \text{ mm}^3$	5 mm/s	13 mW	63 x
25 μm	$3 \times 3 \times 0,125 \text{ mm}^3$	5 mm/s	19 mW	20 x
5 μm elliptisch	$3 \times 3 \times 0,015 \text{ mm}^3$	3,5 mm/s	8 mW	63 x

Tabelle 5.2: Parameter zur Anfertigung von Gerüststrukturen der Versuchsreihe 2.

Versuchsreihe 2

In einer zweiten Versuchsreihe werden die kleineren Porengrößen, welche zuvor Zelladhäsion aufwiesen, erneut betrachtet. Dabei wird untersucht, ob Fibroblasten an diesen vergleichbar zu Versuchsreihe 1 anwachsen, wenn die Nachbehandlung der Proben modifiziert wird. Hierzu werden Strukturen mit den in Tabelle 5.2 aufgeführten Parametern verwendet. Neben den aus Kreisen aufgebauten Gerüsten wird bei 5 μm Porengröße zusätzlich eine elliptische Form gewählt. Bei der Reinigung der Strukturen wird sich wieder an die Processing Guideline für OrmoComp[®] gehalten. Jedoch wird die Zeitspanne für die Reinigungsschritte erhöht. Diesmal werden die Scaffolds länger (30 min) im Entwickler OrmoDev gereinigt und es sind auch dieses Mal optisch keine Rückstände mehr zu sehen. Danach werden die Proben länger in Isopropanol geschwenkt und mit diesem abgespült. Abschließend werden die Proben für 3 Stunden bei 150 °C auf einer Heizplatte ausgebacken und danach noch einmal mit Isopropanol gereinigt.

Auf die sterilisierten Prüfkörper wird diesmal eine Aussaat von 15 000 Zellen/cm² konzentriert als Zellsuspension direkt auf den Gerüststrukturen platziert. Auch in dieser Versuchsreihe zeigen die Beurteilung der Zellmorphologie und der Zelladhäsion eine geringere Adhäsion und Proliferation mit steigender Porengröße. Teilweise gibt es zudem große Unterschiede bei der Adhäsion und Proliferation zwischen Prüfkörpern gleicher Dimension.

Außerdem werden vier auf Glassubstrate aufgetragene Tropfen von OrmoComp[®] mit einer Deuteriumlampe 2 Stunden lang ausgehärtet und anschließend bei Umgebungslicht für mehrere Tage gelagert. Zwei der vier Proben werden mit OrmoDev und Isopropanol gereinigt, die anderen beiden Proben bleiben unbehandelt. Anhand dieser Prüfkörper wird identifiziert, dass die verwendeten Reinigungsmittel Einfluss auf die Toxizität haben. Die nicht nachbehandelte Probe zeigt starke Toxizität auf die Zellen, wohingegen bei der entwickelten Probe die Zellen vitaler sind. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass Rückstände des nicht ausgehärteten OrmoComp[®] oder sogar das ausgehärtete Material Ursache für das Sterben der Zellen sind. Ein Ansatz um dies zu prüfen ist eine zusätzliche längere Bestrahlung der Strukturen mit einer UV-Lichtquelle, welche die Proben vollständig aushärtet. In [161] wurde ein solcher Nachbehandlungsschritt bereits angewandt, jedoch nicht weiter untersucht.

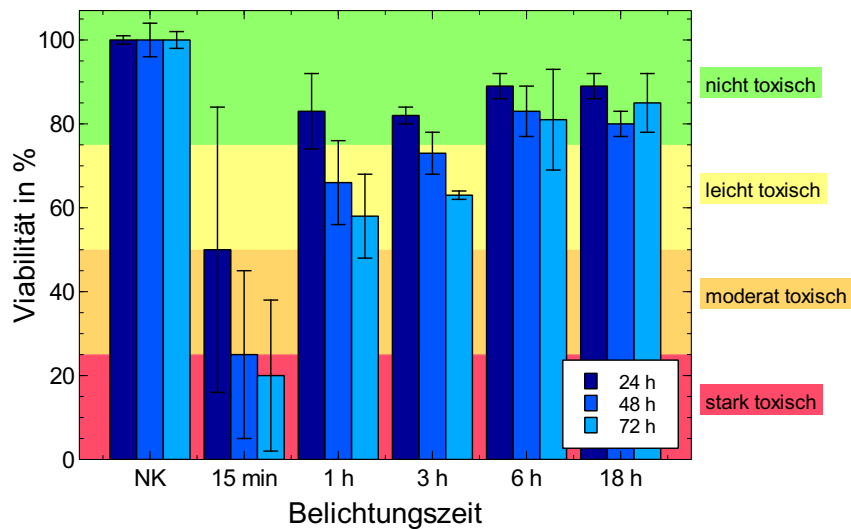


Abbildung 5.4: Viabilität von Fibroblasten auf ausgehärteten Tropfen von OrmoComp® nach einer UV-Belichtung von 15 Minuten und 1, 3, 6 und 18 Stunden sowie Zytotoxizität nach 24, 48 und 72 Stunden Zellkultur.

Versuchsreihe 3

Um Information über den Einfluss einer UV-Nachbelichtung der Proben auf die Viabilität der Zellen zu erhalten, werden gleichgroße Tropfen ((12 ± 2) mg) von OrmoComp®, welche unterschiedlichen Belichtungszeiten ausgesetzt werden, mit einem Zytotoxizitätstest analysiert. Jeweils drei Proben mit Tropfen auf Glassubstraten werden mit Licht der Wellenlänge 365 nm und einer Leistungsdichte von $24,6 \text{ mW/cm}^2$ für 15 Minuten und 1, 3, 6 und 18 Stunden ausgehärtet. Anschließend werden auch hier primäre, humane, dermale Fibroblasten² auf die derart polymerisierten Tropfen appliziert und die Zellviabilität mit einem quantitativen Zytotoxizitätstest bestimmt. Zellen in einem Nährmedium ohne OrmoComp® dienen als Negativkontrolle.

Eine Analyse der Tropfen zeigt einen Anstieg der Zellviabilität abhängig von der Belichtungszeit nach 24, 48 und 72 Stunden Zellkultur. Die Viabilität ist nach einer Belichtung von 6 und 18 Stunden im nicht toxischen Bereich (Viabilität $> 75\%$), wie in Abbildung 5.4 zu sehen ist. Folglich wird eine UV-Belichtung von 18 Stunden für die nachfolgenden Gerüststrukturen verwendet. Die Viabilität von $< 75\%$ nach einer Belichtungszeit von 15 Minuten weist darauf hin, dass Rückstände von unausgehärtetem Material die Toxizität verursachen.

Versuchsreihe 4

In einer weiteren Versuchsreihe werden wieder Gerüststrukturen betrachtet. Da an kleineren Porengrößen Zelladhäsion nachgewiesen wurde, werden nun im Vergleich zu Versuchsreihe 1 und 2 auch Strukturen mit größeren Poren, wie in Tabelle 5.3 dargestellt, betrachtet. Für die Nachbehandlung der Gerüste werden diese, genauso wie

² Cat.: FC-0024

Porengröße	Gesamtvolumen	Geschwindigkeit	Leistung	Objektiv
15 μm	3,00 x 0,42 x 0,21 mm ³	5 mm/s	12 mW	63 x
20 μm	3,00 x 0,52 x 0,20 mm ³	5 mm/s	13 mW	63 x
25 μm	3,00 x 0,60 x 0,20 mm ³	5 mm/s	13 mW	63 x
35 μm	3,08 x 1,12 x 0,21 mm ³	5 mm/s	24 mW	20 x
50 μm	3,00 x 1,00 x 0,20 mm ³	5 mm/s	33 mW	20 x
70 μm	3,08 x 1,12 x 0,21 mm ³	5 mm/s	54 mW	20 x
100 μm	3,00 x 1,00 x 0,20 mm ³	5 mm/s	64 mW	20 x

Tabelle 5.3: Parameter zur Anfertigung von Gerüststrukturen der Versuchsreihe 4.

in Versuchsreihe 2, 30 Minuten in OrmoDev entwickelt, anschließend mit Isopropanol gereinigt, 3 Stunden bei 150 °C auf einer Heizplatte ausgebacken und danach noch einmal mit Isopropanol gereinigt. Darüber hinaus werden die Proben 18 Stunden mit einer UV-Lichtquelle (siehe Versuchsreihe 3) bestrahlt.

Erneut ist nach der Aussaat von Fibroblasten auf den sterilisierten Prüfkörpern ein Sterben der Zellen zu beobachten. Bereits bei den Strukturen mit einer Porengröße von 15 μm bis 25 μm ist dies sichtbar und deutet darauf hin, dass die UV-Bestrahlung allein nicht ausreicht bei diesen makroskopischen Strukturen mit großer Oberfläche und zahlreichen kleinen Löchern zwischen den Poren toxisch wirkendes Restmaterial vollständig zu entfernen. Daher werden in einer weiteren Versuchsreihe die Nachbehandlungsschritte erweitert.

Versuchsreihe 5

Neben einem 30-minütigen Entwickeln der Scaffolds in Ormodev und anschließendem Reinigen mit Isopropanol werden in dieser Versuchsreihe Proben mit Porengrößen aus Tabelle 5.3 dreimal für 24 Stunden in Ethanol gereinigt um alle Rückstände herauszuwaschen. Dazu liegen die Proben in mit Ethanol gefüllten Schalen und werden während des Waschens geschüttelt³. Danach werden die Strukturen anstatt 3 Stunden bei 150 °C auf einer Heizplatte 5 Stunden bei 250 °C ausgebacken. Ein Excimerlaser ($\lambda = 248\text{ nm}$) belichtet außerdem einen Teil der Prüfkörper, bevor alle Proben für Zellversuche sterilisiert werden.

Auf den präparierten Strukturen werden Fibroblasten aufgebracht und untersucht. Diesmal sind die Scaffolds nicht toxisch und auf allen Porengrößen sind Zellen zu sehen. Nach vier Tagen sind mehr Zellen vorhanden als nach einem Tag. Somit ist davon auszugehen, dass Zellwachstum auf den Strukturen stattfindet. Lichtmikroskopische Aufnahmen lassen keinen Unterschied zwischen Proben mit und ohne Excimer-Laserbestrahlung erkennen, so dass auf diese zusätzliche Bestrahlung verzichtet werden kann. Eine vertiefende Studie zur Adhäsion und Proliferation von humanen Fibroblasten an Gerüststrukturen wird daraufhin unter Anwendung der hier aufgezeigten Nachbehandlungsschritte durchgeführt.

³ Schüttelgerät Titramax 101

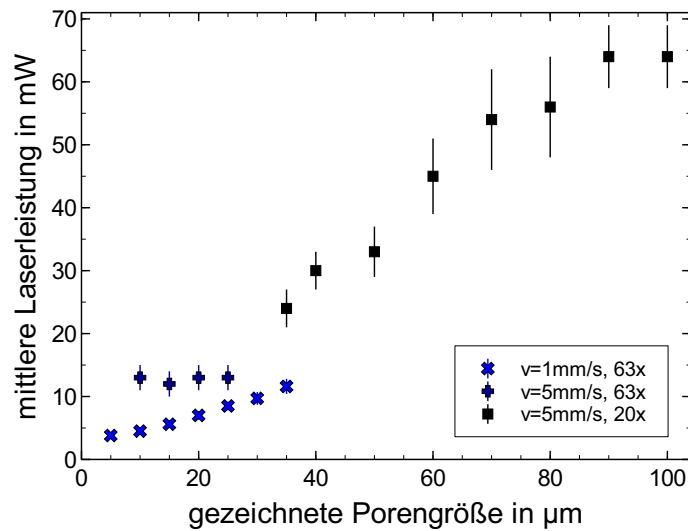


Abbildung 5.5: Optimale mittlere Laserleistungen nach dem Objektiv zur Herstellung von Gerüststrukturen.

5.2.2 Adhäsion und Proliferation von humanen Fibroblasten

Gerüststrukturen mit Porengrößen aus Tabelle 5.3 werden mit der Single-line single-pass Technik angefertigt, in geeigneten Nachbehandlungsschritten gereinigt und für Studien mit humanen Fibroblasten herangezogen.

Gerüststrukturen

Abbildung 5.5 zeigt die dafür am besten geeigneten mittleren Laserleistungen nach dem Objektiv um stabile, poröse, periodische und reproduzierbar große Scaffolds herzustellen. Diese Laserleistungen wurden so bestimmt, dass die Strukturen sowohl mit schmalen Verstrebungen und somit hoher Porosität geschrieben werden als auch mit einer ausreichenden Stärke um Deformationen oder sogar Einstürzen der Gerüste zu vermeiden. Eine hohe Porosität wird in Anbetracht der Ergebnisse von [151], welche Zellwachstum an Scaffolds mit hoher Porosität zeigen, angestrebt. Gerüststrukturen mit größeren Poren brauchen eine höhere Stabilität der Verstrebungen, denn die Anzahl der Verstrebungen nimmt mit steigender Porengröße ab. Dies wird durch eine Erhöhung der Laserleistung erreicht. Aufgrund des größer werdenden Unterschieds zwischen definierter und tatsächlicher Position und Geschwindigkeit der beweglichen Achsen während des Schreibprozesses wird die Schreibgeschwindigkeit auf 5 mm/s limitiert. Dies fällt vor allem bei kleineren Porengrößen ins Gewicht, bei welchen während den Richtungsänderungen schneller beschleunigt und abgebremst werden muss. Die gezeichneten Porengrößen von 5 μm bis 100 μm führen unter Berücksichtigung von materialabhängiger Schrumpfung zu Porengrößen von 5 μm bis 90 μm bei den fertiggestellten Strukturen. Die Porengrößen der verwendeten Scaffolds für die Adhäsions- und Proliferationsversuche werden zusammen mit den Produktionszeiten für ein Volumen von $3 \times 3 \times 0,2 \text{ mm}^3$ in Tabelle 5.4 bereitgestellt. Vor allem die Herstellung der kleinen Porengrößen, bei welchen durch Zwei-Photonen-Polymerisation in kurzer Produkti-

gezeichnete Porengröße	15 μm	20 μm	35 μm	50 μm	70 μm	100 μm
Porengröße	10 μm	15 μm	30 μm	45 μm	60 μm	90 μm
Herstellungszeit	270 min	145 min	58 min	24 min	15 min	6,3 min

Tabelle 5.4: Porengrößen der Scaffolds für Adhäsions- und Proliferationsversuche und Herstellungszeiten für ein Volumen von $3 \times 3 \times 0,2 \text{ mm}^3$.

onszeit sub-Mikrometer Eigenschaften, in diesem Fall die Wände zwischen den Poren, mit einem makroskopischen Objekt vereint werden, erfordern die Bestimmung von optimalen Prozessparametern.

Für Gerüststrukturen mit einer gezeichneten Porengröße von $100 \mu\text{m}$ und einer Dimension von $3 \times 3 \times 0,2 \text{ mm}^3$ wird die Produktionszeit auf 6,3 Minuten reduziert. Eine Woodpile-Struktur mit gleicher Porengröße und Volumen braucht im direkten Vergleich mit dem selben Aufbau 15 Stunden (circa 140-mal langsamer) bis zur Fertigstellung. Verglichen mit anderen vor kurzem veröffentlichten Untersuchungen mit Zellkulturen auf durch Laserdirektschreiben hergestellten Scaffolds [51, 151], haben die mit der Single-line single-pass Technik geschriebenen Strukturen ein größeres Volumen und eine signifikant kürzere Produktionszeit. Die hier untersuchten Gerüste sind 18-mal größer und bei gleichem Volumen circa 170-mal schneller produziert als eine Woodpile-Struktur in [151] mit einer Porengröße von $110 \mu\text{m}$ und einem Gesamtvolumen von $1 \times 1 \times 0,1 \text{ mm}^3$ gefertigt in einer Stunde mit $1\text{--}3 \text{ mm/s}$. Im Vergleich zu einer Wabenstruktur, präsentiert in [51], mit einem Apothema des Hexagons von $50 \mu\text{m}$, somit einer vergleichbaren Porengröße, einem Gesamtvolumen von $2,1 \times 2,1 \times 0,31 \text{ mm}^3$ und einer Produktionszeit von ungefähr 2,5 Stunden unter Anwendung einer Geschwindigkeit von 7 mm/s umfassen die mit der Single-line single-pass Technik geschriebenen Strukturen fast ein doppelt so großes Volumen und ein gleiches Volumen wird circa 45-mal schneller generiert.

Kultivierung und Präparation von Zellen

Für das Anwachsen von Zellen auf den angefertigten Gerüststrukturen durchlaufen diese zunächst die Nachbehandlungsschritte aus Versuchsreihe 5. Nach einer Dampfsterilisation werden humane Fibroblasten direkt auf den Prüfkörpern ohne eine Proteinbeschichtung, im Gegensatz zu [112, 156], appliziert. Die Zellen haben eine Einsaatdichte von $10\,000 \text{ Zellen/cm}^2$ und sind in $0,5 \text{ ml}$ Zellkulturmedium enthalten. Gezüchtet werden die Zellen in einer befeuchteten Atmosphäre (95 %) bei 37°C und 5 % CO_2 . Die Fibroblasten besiedeln auch das Deckglas, auf dem die Strukturen befestigt sind.

Nach drei, sechs und neun Tagen der Kultivierung werden die Prüfkörper für eine Evaluation der Zelladhäsion, -proliferation und -überleben präpariert. Die Fibroblasten werden in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und mit Glutaraldehyd (2,5 % in PBS, 60 min, $4\text{--}8^\circ\text{C}$) fixiert. Nach einem zweiten Waschschrift (PBS) werden die Fibroblasten mit dem Farbstoff Hoechst 33342 ($1 \mu\text{g/ml}$ in PBS, 30 min, Raumtemperatur), welcher mit der DNA interagiert und blau fluoresziert, gefärbt, gefolgt von einem finalen Waschschrift. Die Dichte der fluoreszierenden Zellkerne auf den Proben wird mittels Lichtmikroskopie analysiert. Dabei entspricht ein Zellkern einem Fibroblast.

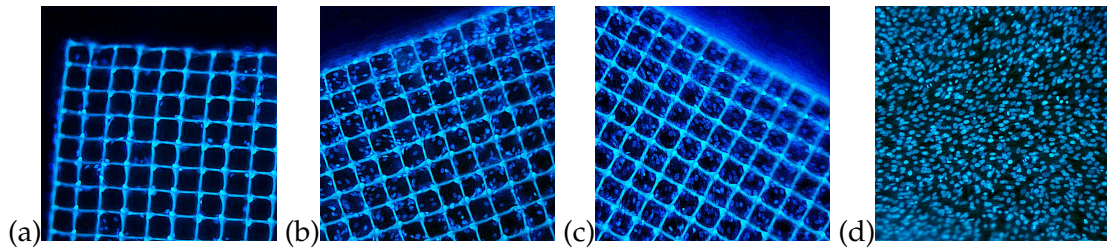


Abbildung 5.6: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von gefärbten Zellkernen auf Scaffolds mit $60\text{ }\mu\text{m}$ großen Poren nach (a) drei Tagen, (b) sechs Tagen, (c) neun Tagen der Kultivierung und (d) auf einem dicht bewachsenen Deckglas.

Bevor die Prüfkörper mit einem Elektronenmikroskop⁴ betrachtet werden, werden die Zellen dehydriert, indem sie mehrere Ethanolkonzentrationen (10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 85 %, 95 % und $\geq 99,8\%$, jeweils für 15 min) in destilliertem Wasser durchlaufen, und unter Verwendung von Hexamethyldisilazan als chemisches Trocknungsmittel getrocknet [5]. REM-Aufnahmen von unbeschichteten Prüfkörpern werden mit einem Ladungsreduktions-Probenhalter gemacht und zeigen Fibroblasten, die eindeutig identifizierbar sind. Eine zusätzliche 15 nm dicke Goldschicht, welche mit einem Hochvakuum-Beschichtungssystem⁵ aufgebracht wird, bewirkt im Gegenzug einen höheren Kontrast zwischen Zellschicht und Substrat bei den aufgenommenen REM-Bildern.

Zellverhalten auf den Gerüststrukturen

Erste Ergebnisse zum Zellverhalten auf den Gerüststrukturen werden durch Fluoreszenzmikroskopie-Bilder der mit Hoechst 33342 gefärbten Zellkerne gewonnen. Ein zeitabhängiger Anstieg der Zellkernanzahl und somit der Fibroblasten war auf allen Prüfkörpern zu beobachten. Dies deutet auf Zellanhaftung und Proliferation auf den Strukturen hin. Auf Scaffolds mit größeren Poren ist eine wesentlich höhere Anzahl an Zellkernen sichtbar und dies impliziert ein stärkeres Zellwachstum. In Abbildung 5.6 ist der Anstieg von fluoreszierenden Zellkernen, die Proliferation von Fibroblasten auf Gerüststrukturen, für $60\text{ }\mu\text{m}$ große Poren dargestellt. Neben den Zellkernen sind aufgrund von Autofluoreszenz auch die Gerüste blau gefärbt. Der nach sechs Tagen (5.6 (b)) untersuchte Prüfkörper lässt mehr Zellkerne erkennen als die Probe nach drei Tagen (5.6 (a)) und gleichermaßen zeigt die nach neun Tagen (5.6 (c)) dicht bewachsene Probe die meisten fluoreszierenden Fibroblasten auf. Außerdem dient ein dicht bewachsenes Deckglas (5.6 (d)) mit einer Zelldichte ähnlich der des $60\text{ }\mu\text{m}$ Scaffolds nach neun Tagen als Referenz.

Des Weiteren werden die unbeschichteten Gerüststrukturen mit einem Rasterelektronenmikroskop unter Verwendung eines Ladungsreduktions-Probenhalters analysiert. Die Zellkerne der Fibroblasten sind auf den Aufnahmen deutlich erkennbar und auch zählbar. Dies ermöglicht es die Proliferation der Zellen durch Zählen der Zellkerne zu bestätigen. Hierfür werden Ausschnitte der oberen Fläche von $10\,000\text{ }\mu\text{m}^2$

⁴ Phenom Pro X

⁵ Leica EM SCD500

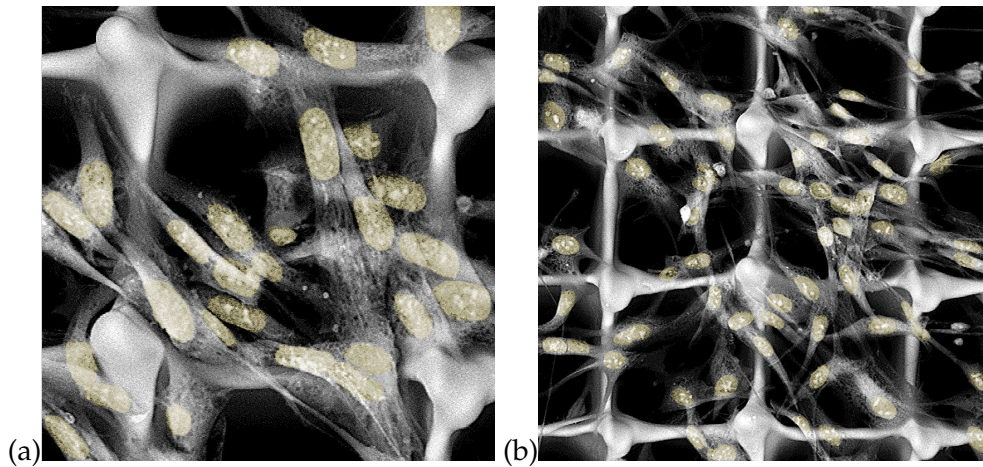


Abbildung 5.7: REM-Aufnahmen eines Ausschnitts von (a) $10\,000\,\mu\text{m}^2$ und (b) $40\,000\,\mu\text{m}^2$ eines unbeschichteten Scaffolds mit $60\,\mu\text{m}$ großen Poren.

und $40\,000\,\mu\text{m}^2$ mit hoher Zelldichte, wie Abbildung 5.7 sie beispielhaft präsentiert, ausgewählt. Die Zellkerne sind für eine bessere Sichtbarkeit in leichtem gelb hervorgehoben. Zudem deuten diese Bilder der oberen Fläche eines Gerüsts darauf hin, dass die Zellen auch in die Poren hineinwachsen.

Die Zählung der Fibroblasten (siehe Abbildung 5.8) zeigt, dass diese bevorzugt auf den Scaffolds mit größeren Poren wachsen. Die Zunahme an Zellkernen abhängig von der Porengröße ist für die beiden unterschiedlich großen Ausschnitte ($10\,000\,\mu\text{m}^2$ und $40\,000\,\mu\text{m}^2$) ähnlich und scheint für größere Poren in Sättigung zu gehen ($60\,\mu\text{m}$ und $90\,\mu\text{m}$). Nach neun Tagen zeigen die Strukturen mit einer Porengröße von $60\,\mu\text{m}$ und $90\,\mu\text{m}$ eine dichte Zellschicht auf der gesamten Probe. Eine Sättigung wird zudem dadurch untermauert, dass die Zahl der Zellkerne für eine Porengröße von $60\,\mu\text{m}$ und $90\,\mu\text{m}$ nach sechs und neun Tagen der Kultivierung von Fibroblasten im selben Bereich ist. Ferner ist es nennenswert, dass nach drei Tagen erst wenige und ungleichmäßig verteilte Zellen auf den Gerüststrukturen sichtbar sind. Nach sechs und neun Tagen ist die Zelldichte deutlich höher und die Fibroblasten sind gleichmäßiger verteilt.

Anschließend werden die Prüfkörper mit einer $15\,\text{nm}$ dicken Goldschicht beschichtet und erneut mit einem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Dadurch ist die Zellschicht auf den Gerüsten besser detektierbar und durch die gemachten Aufnahmen lassen sich weitere Erkenntnisse zum zeitabhängigen Zellverhalten gewinnen. Abbildung 5.9 präsentiert die beschichteten $60\,\mu\text{m}$ Strukturen im Verlauf der Zeit. Am Tag neun ist eine dichte Zellschicht auf der gesamten Probe vorhanden. Die Evaluation der beschichteten Prüfkörper bestätigt die Ergebnisse der Zellproliferation, welche durch Fluoreszenzmikroskop- und REM-Aufnahmen ohne Beschichtung erzielt wurden.

Diese Untersuchung mit dem Rasterelektronenmikroskop liefert zudem Informationen zur Orientierung der Zellen. Es gibt einen Unterschied zwischen Fibroblasten, welche an Strukturen mit Vorzugsrichtung und ohne Vorzugsrichtung anwachsen, wie in Abbildung 5.10 (a) sichtbar wird. An Gerüststrukturen mit einer Porengröße von $10\,\mu\text{m}$, welche eher eine Linienstruktur aufweisen und somit eine Vorzugsrichtung haben, ist festzustellen, dass die Zellen parallel zu den parallelen Linien ausgerichtet und langgestreckt sind.

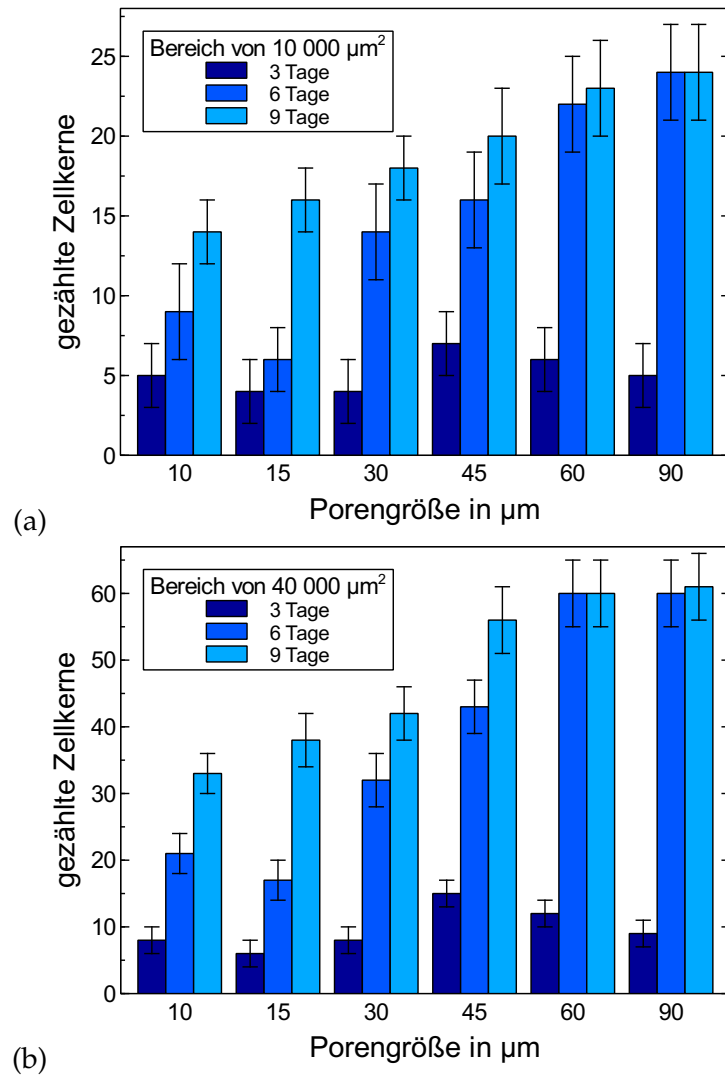


Abbildung 5.8: Gezählte Zellkerne von Fibroblasten auf Scaffolds mit Porengrößen von 10, 15, 30, 45, 60 und 90 μm nach drei, sechs und neun Tagen der Kultivierung für einen Ausschnitt von (a) 10 000 μm^2 und (b) 40 000 μm^2 .

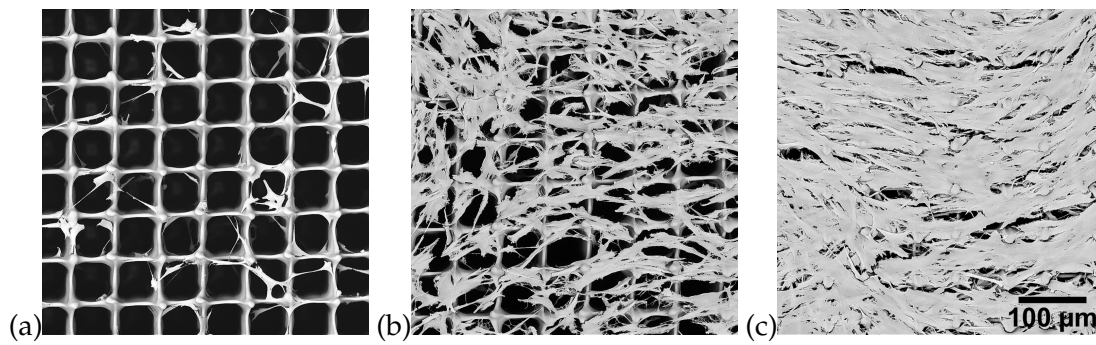


Abbildung 5.9: REM-Aufnahmen gleich großer Ausschnitte von Scaffolds mit 60 µm großen Poren nach (a) drei Tagen, (b) sechs Tagen, (c) neun Tagen der Kultivierung.

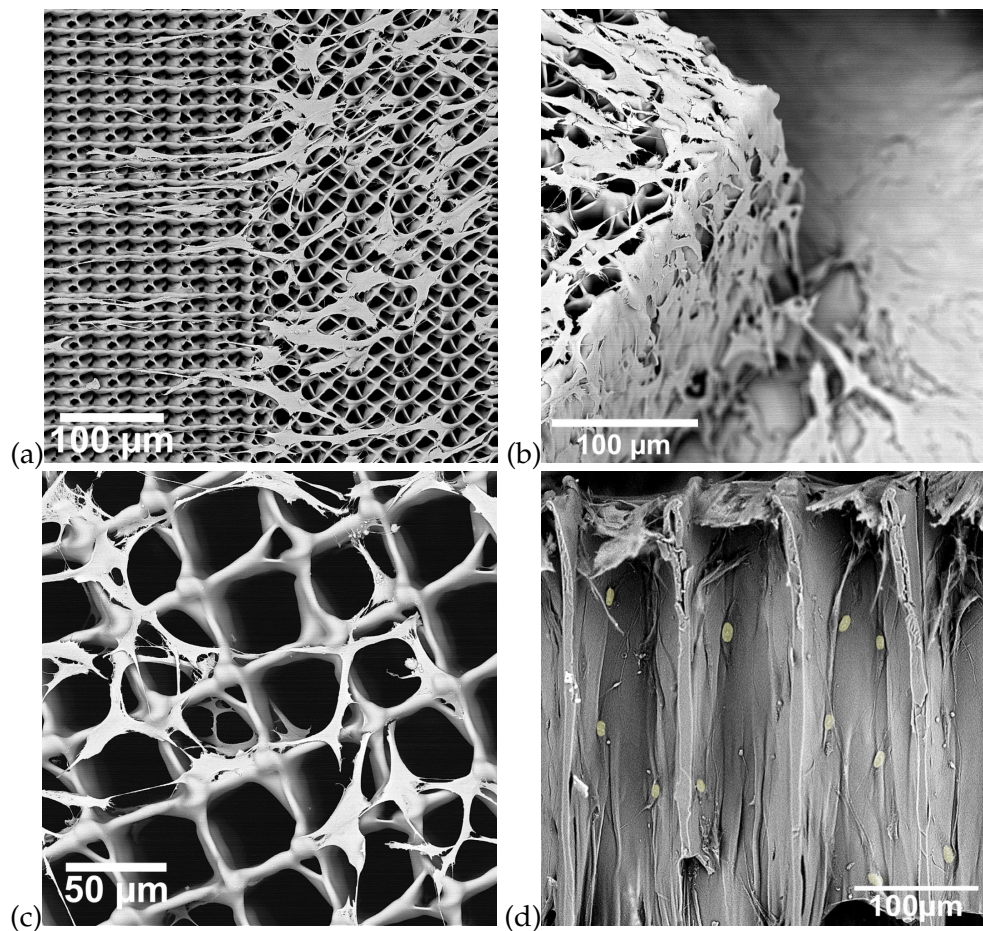


Abbildung 5.10: REM-Aufnahmen von (a) Zellen mit Vorzugsrichtung (linke Seite) und ohne Vorzugsrichtung (rechte Seite), (b) seitliche Betrachtung eines Gerüsts, (c) Hineinwachsen der Zellen in das Gerüst und (d) Zellwachstum innerhalb eines Scaffolds.

Bereits in [9, 161] wurde von einer Streckung und Orientierung von Fibroblasten entlang selbständig stehender Fasern, Kreuzstrukturen und parallelen Linienstrukturen aus OrmoComp[®] berichtet. Diese Arbeit ist ein Schritt hin zu komplexeren Systemen, welche die vorherigen Ergebnisse bestätigen. Im Gegensatz dazu wird ein derartiger Einfluss auf die Ausrichtung der Zellen bei den anderen Gerüsten mit einer Porengröße von $> 10 \mu\text{m}$ und ohne Vorzugsrichtung nicht beobachtet.

Eine seitliche Betrachtung der Gerüste (siehe Abbildung 5.10 (b)) zeigt, dass die Fibroblasten ebenfalls auf den vertikalen Flächen der quaderförmigen Strukturen wachsen. Unter der Annahme einer Sedimentation der Zellen nach der Aussaat demonstriert dieses Anwachsverhalten ein selbständiges Wachsen der Zellen und gute Adhäsion sowohl auf den vertikalen Wänden als auch über die gesamte Struktur. Das Deckglas in Abbildung 5.10 (b) ist dicht bewachsen und die Fibroblasten wachsen über die Kante zwischen Scaffold und Substrat hinweg. Somit ist es nicht länger notwendig Sedimentation durch einen besonderen Aufbau wie in [42] zu verhindern, um eine Adhäsion der Zellen an steilen Oberflächen zu erreichen.

In Abbildung 5.10 (c) ist das Hineinwachsen der Zellen in den Prüfkörper erkennbar. Um zu überprüfen, ob die Fibroblasten tiefer in die Poren hineinwachsen, wird eine der Gerüststrukturen vorsichtig vom Substrat gelöst und die Rückseite der Struktur analysiert. Auch auf dieser Seite sind Zellen vorhanden. Darüber hinaus werden Scaffolds mittels eines Skalpell aufgeschnitten und die innere Struktur studiert. Auch in den Poren sind Zellen vorhanden, wie die in leichtem gelb hervorgehobenen Zellkerne in Abbildung 5.10 (d)) zeigen. Dies belegt das Einwachsen und Wachsen der Zellen auf den inneren vertikalen Wänden. Die Proliferation der Fibroblasten auf beidem, den äußeren Flächen und dem Inneren der Gerüststrukturen, bestätigt, dass die Zellen sich nach wenigen Tagen über dem gesamten Prüfkörper verbreiten und lässt auf dreidimensionales Zellwachstum auf Strukturen aus OrmoComp[®] schließen.

5.3 ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden stabile, periodische und reproduzierbare Gerüststrukturen mittels einer effizienten Single-line single-pass Schreibtechnik hergestellt und die Produktionszeit stark reduziert. Somit ist es möglich Scaffolds mit einer Porengröße von $90 \mu\text{m}$ und einem Volumen von $3 \times 3 \times 0,2 \text{ mm}^3$ in nur 6,3 Minuten anzufertigen. Außerdem wurde die Adhäsion und Proliferation von Fibroblasten auf Gerüsten mit unterschiedlich großen Poren von $10 \mu\text{m}$ bis $90 \mu\text{m}$ vertiefend untersucht. Insbesondere war das Identifizieren einer passenden Nachbehandlung der geschriebenen Scaffolds von Bedeutung um sicherzustellen, dass keine Toxizität bei der Kultivierung von Zellen vorliegt. Es wurde Zelladhäsion, Zellproliferation und Zellüberleben drei, sechs und neun Tage nach Aussaat der Zellen nachgewiesen. Die Gerüste mit $90 \mu\text{m}$ großen Poren zeigen das beste Wachstum und sind nach neun Tagen dicht besiedelt. Das vertikale und horizontale, äußere und innere Zellwachstum bestätigt, dass Gerüststrukturen aus OrmoComp[®] ohne die Unterstützung durch Proteinbeschichtungen für dreidimensionales Zellwachstum geeignet sind. Zusammenfassend sind die erzielten Ergebnisse eine vielversprechende Grundlage um für spezifische Anwendungen in der Gewebezüchtung geeignete dreidimensionale Strukturen zu generieren.

VEREINIGUNG VON LASERDIREKTSCHREIBEN UND STEREOGRAPHIE

Das Laserdirektschreiben mittels Zwei-Photonen-Polymerisation hat, wie bereits in Kapitel 5 anhand des Single-line single-pass Schreibprozesses für Gerüststrukturen gezeigt wurde, den Vorteil, dass beliebige Formen unabhängig von einer Schicht für Schicht Herstellung und mit einer hohen Präzision angefertigt werden können [152, 162]. Jedoch ist die Anwendbarkeit dieser Methode aufgrund einer meist hohen Prozessdauer von mehreren Stunden pro Kubikmillimeter [149–151] auf kleinere Objekte beschränkt. Durch paralleles Bearbeiten des Materials mit mehreren Teilstrahlen [92, 163], Anpassen des gleichzeitig polymerisierten Volumens durch Variation des Objektivs [154] und eine Minimierung des Fahrwegs [164], wie in Kapitel 5, kann der Prozess weiter optimiert werden. Dabei wird allerdings nichts an der für diesen Prozess charakteristischen punktuellen Aushärtung verändert. Aus diesem Grund gibt es mehrere Ansätze Zwei-Photonen-Polymerisation mit anderen geeigneten Verfahren zu kombinieren.

In diesem Kapitel wird auf ein hybrides Verfahren vertieft eingegangen, welches im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde und Zwei-Photonen-Polymerisation und Stereolithografie in einem Aufbau und gemeinsamen Herstellungsverfahren vereint. Dies ermöglicht eine präzise und schnelle Anfertigung von makroskopischen dreidimensionalen Objekten mit hochauflösenden funktionalen Merkmalen. Eine erste erfolgreiche Umsetzung dieses innovativen Ansatzes wird am Beispiel von Scaffolds in einer äußeren Hülle demonstriert. Dabei werden poröse Gerüststrukturen mit unterschiedlicher Porengröße von einem Ring umgeben, damit sich ausgesäte Zellen gehalten durch die äußere Hülle nicht über dem gesamten Substrat ausbreiten, wodurch eine Einsparung an Zellsuspension, schnelleres Wachstum und eine besser kontrollierbare Umgebung zu erwarten sind. Verglichen mit Zwei-Photonen-Polymerisation wird der Ring durch die Anwendung einer linearen Absorption 500-mal schneller hergestellt. Zudem wird anhand eines fluidischen Systems gezeigt, dass der hybride Prozess für unterschiedliche Anwendungen geeignet ist.

6.1 KOMBINIERTES VERFAHREN MIT ZWEI-PHOTONEN-POLYMERISATION

Die additive Fertigung stößt im Bereich der optischen, medizinischen und Lab-on-a-Chip Anwendungen aufgrund ihres Potenzials für eine hoch aufgelöste, zeitsparende und kosteneffiziente Herstellung von dreidimensionalen Objekten auf ein großes Interesse. Optische Verfahren ermöglichen überdies eine Variation der Lichtquelle und der Belichtungsparameter, was zu einer enormen Flexibilität in der Wahl des

Materials und Geometrie der anzufertigenden Strukturen führt [2]. Die Zwei-Photonen-Polymerisation zeichnet sich hierbei durch ihre hohe Auflösung und das tatsächliche dreidimensionale Schreiben aus. Im Gegensatz zu anderen Techniken ist das punktuelle Aushärten eines Materials durch einen Mehrphotonenprozess wie die Zwei-Photonen-Polymerisation allerdings sehr zeitaufwändig. Kombinierte Verfahren aus Laserdirektschreiben und anderen, schnelleren Methoden rücken daher stärker in den Fokus.

6.1.1 Vorstellung verschiedener Strategien

Neben dem hier präsentierten Ansatzes zur Umsetzung eines hybriden Prozesses aus Zwei-Photonen-Polymerisation und Stereolithografie haben einige Gruppen bereits das additive Laserdirektschreiben mit subtraktiven Herstellungsverfahren verbunden. Dies wurde zum einen dadurch realisiert, dass ein Ultrakurzpulslaser sowohl für Zwei-Photonen-Polymerisation als auch zur Ablation von Material verwendet wurde [4, 165], und zum anderen dadurch, dass ein fotosensitives Material zunächst belichtet wurde, gefolgt von einem Ätzprozess [166]. Ein weiterer Ansatz basiert auf der schnellen Vervielfachung einer durch Zwei-Photonen-Polymerisation hergestellten Struktur mittels Mikroabformungstechniken [5, 157]. Zudem wurde die Schmelzschichtung, ein schnelles 3D-Druckverfahren, bei welchem Thermoplaste über den Schmelzpunkt erhitzt und durch eine feine Düse aufgetragen werden, eingesetzt um Körper aufzubauen, die in einem nächsten Schritt mit Zwei-Photonen-Polymerisation weiter modifiziert werden [167, 168]. Im Vergleich dazu hat die Verwendung von Stereolithografie als zusätzliches Verfahren den Vorteil, dass es eine additive optische Methode ist, welche ähnliche oder sogar gleiche Materialien wie die Zwei-Photonen-Polymerisation nutzt. Die Idee ein Material zusätzlich zur Zwei-Photonen-Polymerisation mit linearer Absorption zu polymerisieren ist aus der Literatur bekannt. In einem Ansatz wurde eine zweidimensionale periodische Strukturen mittels Interferenz von zwei Strahlen großflächig erzeugt und anschließend durch Zwei-Photonen-Polymerisation modifiziert [169]. Darüber hinaus besteht, wie bereits in Abschnitt 2.4.1 beschrieben, die Möglichkeit nur eine Hülle durch Zwei-Photonen-Polymerisation zu generieren und den Kern in einem späteren Belichtungsschritt mit UV-Licht auszuhärten. Bei diesen Verfahren findet eine lineare Absorption von Licht allerdings im Vergleich zu dem hier eingeführten Konzept losgelöst von der Zwei-Photonen-Polymerisation in einem separaten Prozessschritt statt.

In konventionellen Systemen für Stereolithografie wird ein fotoempfindliches Material an der Oberfläche durch lineare Absorption des Lichts einer UV-Lichtquelle ausgehärtet und eine dreidimensionale Struktur schichtweise aufgebaut [170]. Dabei wird eine Genauigkeit im Bereich von 1 bis 150 μm erreicht [55, 171], wodurch wesentlich größere Volumina als mit Mehrphotonenabsorption (Genauigkeit von etwa 200 nm) polymerisiert werden können. Dies spiegelt sich auch in der Herstellungsdauer von makroskopischen Objekten wieder. Teile mit einer Größe im Bereich von 1000 cm^3 können mittels Stereolithografie innerhalb von einigen Stunden hergestellt werden, wohingegen die Zwei-Photonen-Polymerisation abhängig von der Auflösung für Objekte mit einer Größe von 1 cm^3 mehrere Tage benötigt. Somit ist eine schnelle Prozessdauer mit zugleich hoher Genauigkeit bei den einzelnen Verfahren schwer umsetzbar.

Eine Lösung zur Kombination von Stereolithografie und Zwei-Photonen-Absorption wird in einem Patent von Tani [172] vorgestellt. Mit einer ersten Lichtquelle und geringer Auflösung soll eine vorläufige Form gebildet werden, welche anschließend mit einer zweiten Lichtquelle unter Mehrphotonenabsorption fertiggestellt wird. Die beiden Lichtquellen werden hierfür in ihrer Lichtleistung angepasst und an einem Punkt fokussiert, so dass ein fotoempfindliches Material aushärtet. Außerdem ist die Position des Fokus innerhalb des Materials variierbar um dreidimensionale Objekte zu erschaffen. Da bei dieser Methode zunächst eine Grundform schichtenweise angefertigt wird, bei welcher ein wesentlich größeres Volumen als bei der anschließenden Zwei-Photonen-Absorption gleichzeitig verfestigt werden kann, kommt es zu einer enormen Zeitersparnis. Anschließend wird ein fokussierter Lichtstrahl mit geeigneter Wellenlänge für Mehrphotonenabsorption verwendet um aufbauend auf der bereits erstellten Form schichtenweise das gewünschte Objekt mit hoher Genauigkeit fertigzustellen.

Eine Schwäche dieser Methode ist, dass der Mehrphotonenprozess erst nach Fertigstellung der Grundform angewendet wird. Der Bereich, welcher mit Mehrphotonenabsorption bearbeitet werden kann, ist somit durch den Arbeitsabstand der Fokussieroptik begrenzt. Bei höheren Genauigkeiten und damit verbunden geringeren Arbeitsabständen wird dieser Bereich immer stärker eingeschränkt. Bereits bei Gegenständen mit einer Größe im Millimeterbereich ist es daher, abhängig von der Auflösung, zum Teil nur möglich die Struktur der äußeren Oberfläche des Objekts mit Mehrphotonenabsorption zu modifizieren. Diese Einschränkung wird mit dem in Abschnitt 6.1.2 vorgestellten neuartigen Verfahren überwunden.

Darüber hinaus ist die Fokussierung des Bearbeitungsstrahls in nur einem Punkt ohne weitere Strahlformung oder Strahlaufteilung in mehrere Teilstrahlen als Nachteil der Methode von Tani anzusehen. Durch die Parallelisierung des Prozesses kann die Produktionszeit vor allem bei längeren Herstellungsdauern signifikant verkürzt werden. Neben einer Vielzahl von Veröffentlichungen [88, 92, 133, 153, 163, 173, 174] zeigt ein Patent von Houbertz-Krauß et al. [175] ein Konzept zur Strahlmodifikation für Zwei-Photonen-Polymerisation. Zum einen wird in [175] der Laserstrahl in zwei Strahlen aufgeteilt, welche jeweils zu einer eigenständigen Fokussieroptik geleitet werden, zum anderen wird ein zusätzliches Strahlformungselement vor der Fokussieroptik in den Strahlengang integriert. Dieses Verfahren wendet jedoch nur einen Mehrphotonenprozess an, so dass nach wie vor nur ein sehr kleiner Bereich um den Brennpunkt gleichzeitig polymerisiert wird. Ein entsprechendes Konzept für eine Kombination aus Stereolithografie und Laserdirektschreiben mittels Zwei-Photonen-Polymerisation wird in Abschnitt 6.1.2 berücksichtigt.

6.1.2 *Hybrides Konzept für Laserdirektschreiben und Stereolithografie*

Ausgehend von den in Abschnitt 6.1.1 vorgestellten Verfahren wurde im Zuge dieser Arbeit ein hybrides Konzept erarbeitet und patentiert [176], welche sowohl eine hohe Genauigkeit durch Laserdirektschreiben als auch eine reduzierte Prozessdauer durch Stereolithografie bietet. Zur Umsetzung des entwickelten Konzepts ist ein optischer Aufbau notwendig, welcher in unterschiedlichen Varianten realisiert werden kann und folgende Komponenten enthält:

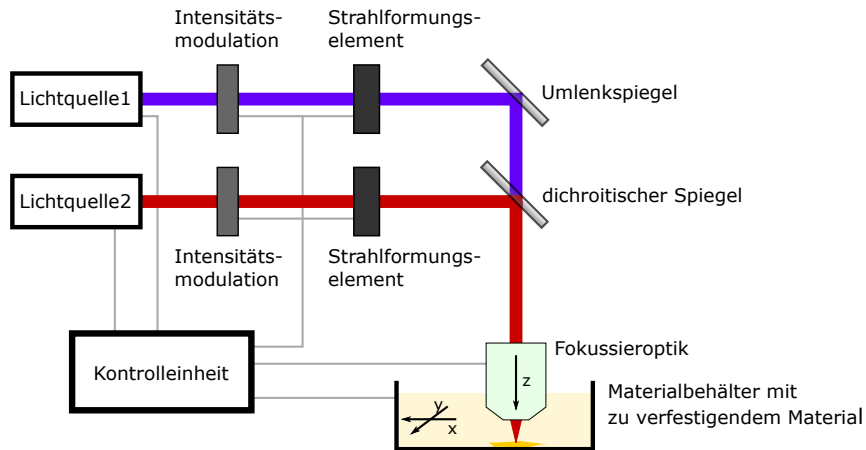


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung des Aufbaus mit zwei Lichtquellen und einer Fokussieroptik, welche in das Material eingetaucht wird.

Der Aufbau weist entweder zwei unabhängige oder eine Lichtquelle mit zusätzlicher Verwendung der höheren Harmonischen auf. Überdies besitzt die Vorrichtung Intensitätsmodulatoren, Strahlformungselemente und eine oder mehrere Fokussieroptiken. Die Fokussieroptik und die Trägereinheit, auf welche das Objekt aufgebaut wird, sind derart zueinander beweglich, dass dreidimensionale Formen herstellbar sind.

Ausführungen des Aufbaus

In Abbildung 6.1 ist eine mögliche Ausführung des Aufbaus mit zwei separaten Lichtquellen zu sehen. Lichtquelle 1 ist dabei im ultravioletten oder sichtbaren Bereich und für Stereolithografie geeignet. Das Licht wird im fotoempfindlichen Material linear absorbiert und führt bei Bestrahlung mit geeigneter Energie zur Aushärtung des Materials. Die zweite Lichtquelle soll eine Zwei- oder Mehrphotonenpolymerisation bewirken. Dafür wird Licht einer Wellenlänge außerhalb des linearen Absorptionsbereichs in das zu verfestigende Material fokussiert, um im Fokus bei ausreichend hoher Energiedichte das Material zu verfestigen. Die Intensität des in das Material eingebrachten Lichts wird mit Hilfe eines Intensitätsmodulators (z. B. ein AOM) reguliert. Durch integrierte Strahlformungselemente (z. B. einem SLM) kann darüber hinaus mit mehreren Teilstrahlen gearbeitet werden um den Prozess zu parallelisieren. Neben der Strahlaufspaltung ist auch eine Änderung des Strahlprofils denkbar, so dass dieses abhängig vom zu fertigenden Objekt angepasst werden kann. Über eine geeignete Fokussieroptik gelangt das Licht schließlich in das Material und härtet dieses in einem optimierten Verfahren aus.

Abbildung 6.2 (a) zeigt einen um eine zusätzliche Fokussieroptik erweiterten Aufbau. Dazu werden die Strahlen der beiden Lichtquellen jeweils mit einem Strahlteiler aufgeteilt und zu zwei separaten Fokussieroptiken geleitet. Das Verwenden von weiteren Fokussieroptiken ist gleichermaßen umsetzbar. Der Vorteil dieser Ausführung ist, dass das zu fertigende Objekt sehr leicht an mehreren Stellen parallel oder mehrere Objekte gleichzeitig bearbeitet werden können. Zudem führt ein Einsatz von Fokussieroptiken mit unterschiedlicher NA zu einer höheren Flexibilität in der Voxelgröße, was sich

positiv auf die Prozessdauer auswirken kann. Zu bedenken ist dabei, dass durch das Verfahren der einzelnen Optiken zueinander das System komplexer wird.

Eine Variante mit nur einer Lichtquelle ist in Abbildung 6.2 (b) dargestellt, wodurch der Aufbau gegenüber zwei Lichtquellen kompakter wird. Da für Stereolithografie eine andere Wellenlänge benötigt wird als für Zwei-Photonen-Polymerisation, wird neben der eigentlichen Wellenlänge der Lichtquelle eine ihrer höheren Harmonischen erzeugt. Die beiden unterschiedlichen Wellenlängen werden mittels eines dichroitischen Spiegels aufgespalten. Anschließend können die beiden getrennten Strahlen wie die einzelnen Lichtquellen in Abbildung 6.1 oder 6.2 (a) behandelt werden.

Bei den bisherigen Ausführungsformen wurde die Fokussieroptik in das fotoempfindliche Material eingetaucht. Eine weitere Option (siehe Abbildung 6.2 (c)) ist es, die Lichtstrahlen von unten, durch eine für die verwendeten Wellenlängen durchlässige Fläche, in den Materialbehälter zu leiten. Das Objekt wird dann anhaftend an einer in z-Richtung beweglichen Trägereinheit aufgebaut.

Herstellungsverfahren

Im Weiteren wird das Verfahren zur Realisierung von dreidimensionalen Objekten beschrieben. Die dazu benötigten Prozessschritte sind anhand eines Blockdiagramms in Abbildung 6.3 aufgezeigt.

Zunächst wird das anzufertigende Objekt mit einem geeigneten CAD-Programm konstruiert und ein Modell für die Herstellung erstellt. Dieses Modell wird in n einzelne, aufeinander aufbauende Schichten zerlegt. Die Schichtdicke ist an die Aushärtung durch Stereolithografie in einer Ebene angepasst und liegt im axialen Auflösungsbereich des linearen Absorptionsprozesses, beispielsweise bei $50\text{ }\mu\text{m}$. Die Dicke einer einzelnen Schicht ist so dünn, dass selbst bei starker Fokussierung und geringem Arbeitsabstand jeder Punkt innerhalb der Schicht mit dem Fokus des Bearbeitungsstrahls erreicht und durch Mehrphotonenpolymerisation bearbeitet werden kann. Folglich ist jeder Punkt des Objekts mit Mehrphotonenabsorption modifizierbar, da jeder Punkt innerhalb jeder Schicht mit diesem Verfahren angefahren werden kann.

Die einzelnen Schichten werden in gröbere Strukturen für die Stereolithografie und feinere Strukturen für die Mehrphotonenpolymerisation aufgeteilt. Dabei soll die Mehrphotonenpolymerisation nur bei möglichst wenigen, kleinen Strukturen zum Einsatz kommen, bei denen die geforderte Genauigkeit nicht anders erzielt werden kann. Zudem werden der Anfahrwege innerhalb und zwischen den einzelnen Strukturen optimiert. Auf diese Weise kann eine minimale Prozessdauer erzielt werden.

Der Schreibprozess selbst beginnt bei Schicht 1 entweder am Boden des Materialbehälters nach oben aufbauend (siehe Abbildungen 6.1) oder an der Trägereinheit nach unten aufbauend (siehe Abbildung 6.2 (c)). Nun werden alle mittels Stereolithografie zu belichtenden Strukturen dieser Schicht bearbeitet. Anschließend werden die Strukturen, bei denen hohe Genauigkeit wichtig ist, mittels Mehrphotonenabsorption ausgehärtet. Sind alle Bereiche des Objekts innerhalb dieser Schicht fertiggestellt, wird nach gleicher Vorgehensweise wie in Schicht 1 mit dem Aufbau des Objekts in Schicht 2 begonnen. Diese schichtweise Herstellung des Objekts wiederholt sich solange bis Schicht n abgeschlossen ist und das vollständige Objekt hergestellt wurde. Anschließend wird das Objekt noch entwickelt und gereinigt, bevor es einsatzbereit ist.

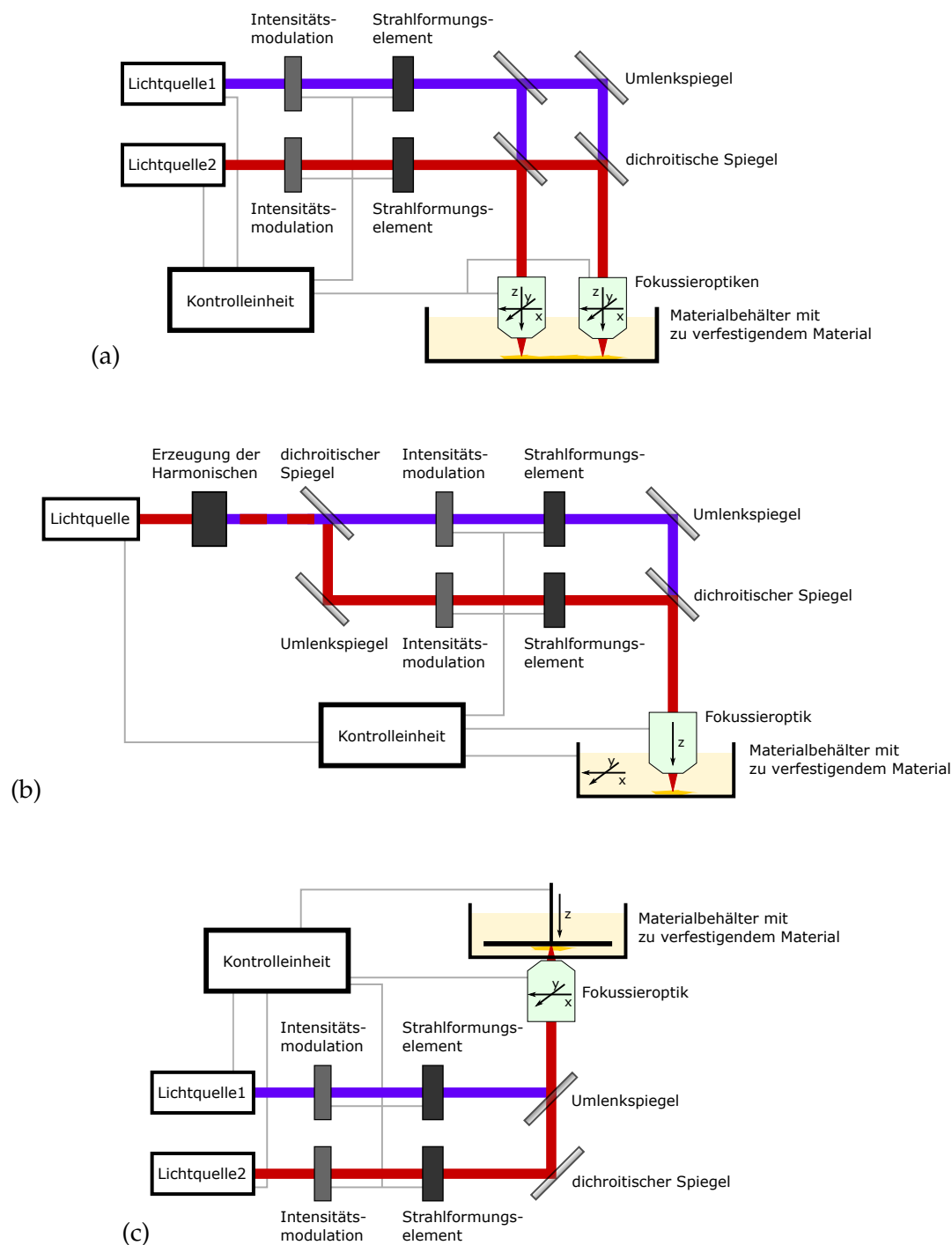


Abbildung 6.2: Schematische Darstellung des Aufbaus mit (a) zwei Lichtquellen und zwei Fokussieroptiken, welche in das Material eingetaucht werden, (b) mit einer Lichtquelle und Erzeugung der Harmonischen, (c) mit zwei Lichtquellen und einer Fokussieroptik, welche den Strahl durch einen durchlässigen Bereich im Materialbehälter fokussiert, um das Objekt auf eine Trägereinheit aufbauend zu fertigen.

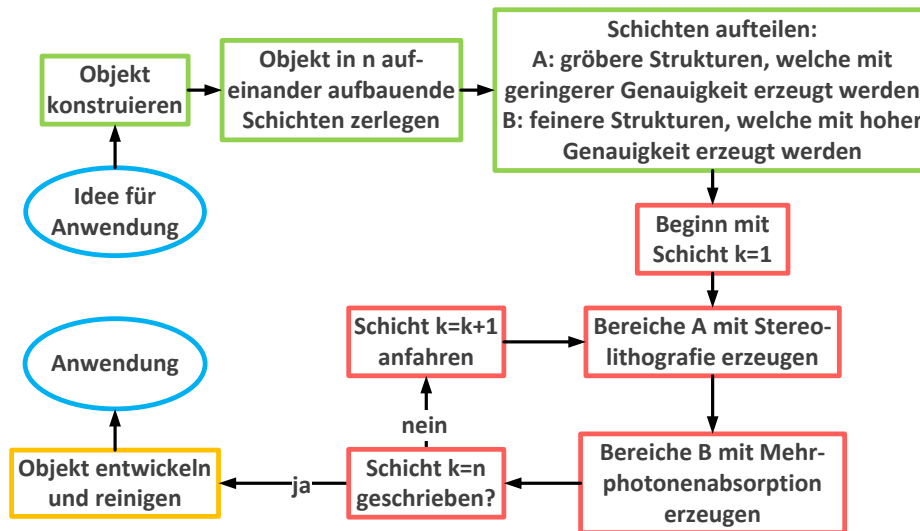


Abbildung 6.3: Blockdiagramm zur Veranschaulichung der aufeinanderfolgenden Prozessschritte.

6.2 UMSETZUNG EINES KOMBINIERTEN FERTIGUNGSVERFAHRENS

Im Folgenden werden die ersten Erfolge in der Umsetzung des in Abschnitt 6.1.2 beschriebenen vielversprechenden hybriden Konzepts vorgestellt. Ein 405 nm cw-Laser für ein Aushärten des Materials durch lineare Absorption und ein 515 nm Ultrakurzpulslaser für Zwei-Photonen-Absorption werden hierfür in ein gemeinsames System integriert, um makroskopische Strukturen mit feinen dreidimensionalen funktionalen Elementen anzufertigen.

6.2.1 Hybrider Herstellungsprozess

Gerüststrukturen in einer äußeren Hülle und ein fluidisches System werden mit dem in Abschnitt 3.3.3 vorgestellten Aufbau realisiert. Ein zusätzlich im System integrierter Ultrakurzpulslaser (siehe Abschnitt 3.3.2) liefert 515 nm Laserpulse mit einer Pulslänge von 540 fs und einer Repetitionsrate von 10 MHz. Der Laserstrahl wird mit einem 20x Objektiv¹ mit einer NA von 0,5 in ein fotoempfindliches Material fokussiert, um dieses mittels nichtlinearer Absorption auszuhärten. Für eine Polymerisation induziert durch lineare Absorption wird ein 405 nm cw-Diodenlaser ebenfalls durch das Objektiv zur Probe geführt.

Dreidimensionale Strukturen werden in einer Schicht aus OrmoComp[®], welches für beide Absorptionsprozesse geeignet [164, 177] ist, aufgetragen zwischen zwei Deckgläsern mit Abstandshaltern hergestellt. Auf die Deckgläser wird entweder zusätzlich OrmoPrime^{®2} mittels Rotationsbeschichtung aufgeschleudert, um die Adhäsion der polymerisierten Struktur zu erhöhen, oder das Deckglas wird mit einer Antihafbeschichtung präpariert, auf welche nun näher eingegangen wird.

¹ ZEISS, EC Epiplan-Neofluar

² micro resist technology

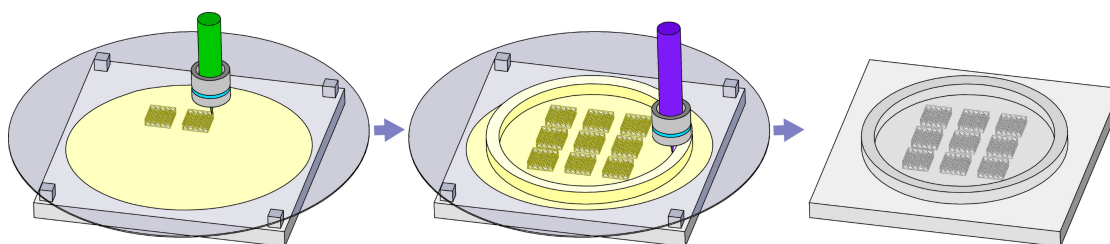


Abbildung 6.4: Fertigungsdiagramm zur Veranschaulichung der Herstellung von Gerüststrukturen umgeben von einem Ring.

Folgende Schritte werden zum Auftragen einer Antihafbeschichtung ausgehend von der Beschreibung von Roos et al. [178] durchgeführt. Vor der Beschichtung werden die Glassubstrate mit Aceton ($\geq 99,5\%$) gesäubert, an der Luft getrocknet und dann 5 Minuten in Isopropanol gereinigt. Die Substrate werden anschließend für 5 Minuten in Isooctan³ eingetaucht, um das Isopropanol an der Glasoberfläche zu ersetzen. Im nächsten Schritt werden die Proben 10 Minuten bei -5°C in eine 4 mmol Lösung von (1,1,2,2H Perfluorooctyl)-trichlorosilan⁴ in Isooctan gehängt, um eine nicht haftende selbstorganisierte Monoschicht zu erzeugen. Reste der Silanlösung werden durch Reinigung der Glassubstrate für 5 Minuten in Isooctan und einer Behandlung mit einem Ultraschallbad für jeweils 5 Minuten in Isopropanol und destilliertem Wasser entfernt. Danach werden die beschichteten Proben mit einem Heißluftgebläse getrocknet und unter Stickstoffatmosphäre bei 200°C für eine Stunde gebacken.

Derart präparierte Glassubstrate kommen bei der Fertigung von Gerüststrukturen umgeben von einem Ring zum Einsatz. Abbildung 6.4 zeigt exemplarisch den Prozess um diese Strukturen zu generieren. Zunächst werden Scaffolds mit einem Zwei-Photonen-Prozess unter Anwendung des 515 nm Lasers auf ein mit OrmoPrime[®] beschichtetes Substrat geschrieben und dann der Ring durch Bestrahlung mit dem 405 nm Laser hinzugefügt. Diese UV-Lichtquelle härtet die Schichtdicke von ungefähr $700\text{ }\mu\text{m}$ zwischen dem unteren und dem oberen Deckglas vollständig aus, so dass die Ringhöhe durch die Schichtdicke des Hybridpolymers bestimmt wird. Eine Antihafbeschichtung auf dem oberen Deckglas verhindert eine Anhaftung des Rings an diesem und stellt die spätere Entfernung dieses Glases sicher.

Ausgehend von der dargestellten Methode das fotoempfindliche Material in einer Schichtanordnung zu bearbeiten, ist eine Idee für zukünftige Anwendungen mit der Fokussieroptik in das fotoempfindliche Material einzutauchen. Dies wird vor allem bei der linearen Absorption dadurch eingeschränkt, dass das Material an der Fokussieroptik aushärtet. Eine zusätzliche Schutzhülle mit einem antihafbeschichteten Fenster, um das Bearbeitungslicht durchzulassen, wie in Abbildung 6.5 illustriert, würde dies verhindern und eine Fertigung von beliebig hohen dreidimensionalen Strukturen ermöglichen.

Eine solche Schutzhülle wurde durch einen das Objektiv umschließenden, hohlen Aluminiumzylinder mit angepasstem Austrittsfenster für das Laserlicht realisiert. Bei ersten Untersuchungen zur Anwendbarkeit war zu beobachten, dass kein verfestigtes

³ CarlRoth, ROTIPURAN[®] $\geq 99,5\%$, p.a., ACS

⁴ Sigma Aldrich

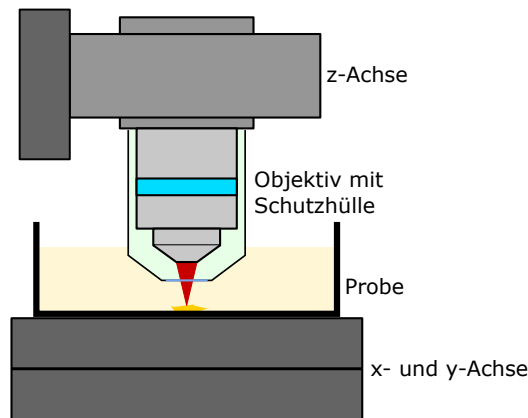


Abbildung 6.5: Schutzhülle mit einem antihafbeschichteten Fenster um Anhaften von Material am Objektiv zu verhindern.

OrmoComp[®] am beschichteten Fenster anhaftet und dass die konstruierte Hülle dicht ist. Der hierfür verwendete größere Tropfen OrmoComp[®] aufgebracht auf einem Substrat wird jedoch schnell von dem beschichteten Fenster an den Rand der Schutzhülle verdrängt. Daher sollte für eine weiterführende Betrachtung eine ausreichende Menge an fotosensitivem Material in einer Wanne eingesetzt werden.

6.2.2 Gerüststrukturen in einer äußeren Hülle

Die in Abschnitt 5.1 vorgestellte Single-line single-pass Schreibtechnik wird genutzt um poröse und reproduzierbare Gerüststrukturen in einer Schicht OrmoComp[®] zwischen zwei Deckgläsern herzustellen. Auch diesmal wird darauf geachtet die Dicke der Verstrebungen, welche das Gerüst formen, schmal zu halten um eine hohe Porosität zu erzielen und dick genug um Deformationen oder sogar einen Einsturz der Strukturen zu vermeiden. Dies wird dadurch umgesetzt, dass die Laserleistung des 515 nm Ultrakurzpulslasers modifiziert wird. Die geeignetsten mittleren Laserleistungen nach dem Objektiv, um mit dem zusätzlich in das System eingebauten Laser (siehe Abschnitt 3.3.2) Strukturen mit verschiedenen Porengrößen von $30\text{ }\mu\text{m}$ bis $110\text{ }\mu\text{m}$ zu erschaffen, sind in Abbildung 6.6 veranschaulicht. Im Vergleich hierzu sind die in Kapitel 5 angegebenen Laserleistungen mit dem im System vorhandenen Laser (siehe Abschnitt 3.1) bestimmt worden. Für größere Poren ist eine höhere Stabilität der Verstrebungen nötig, da die Anzahl der Verstrebungen zum Erreichen dieser größeren Porengrößen reduziert wird. Somit ist eine stärkere Laserleistung notwendig um die Dicke der Verstrebungen direkt proportional zu der Porengröße ansteigen zu lassen. Eine Abhängigkeit zwischen der Laserleistung und der Porengröße kann durch die Betrachtung der Größe eines einzelnen polymerisierten Voxels [27] hergeleitet werden, da die Dicke der Verstrebungen durch die Voxelform bestimmt wird. Die axiale und laterale Größe eines Voxels können mit der Annahme, dass ein Intensitätsschwellwert

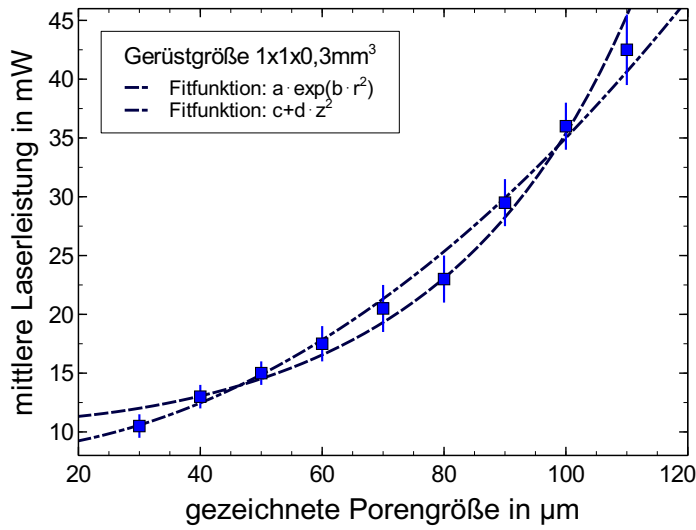


Abbildung 6.6: Optimale mittlere Laserleistungen nach dem Objektiv zur Herstellung von Gerüststrukturen mit dem zusätzlich in das System eingebauten Ultrakurzpuls laser.

zum Starten des Polymerisationsprozesses und ein Gauß-Strahl vorliegen, aus der Gleichung

$$I_{th} = I(r, z) = I_0 \left(\frac{\omega_0}{\omega(z)} \right)^2 \exp \left(\frac{-2r^2}{\omega(z)^2} \right) \quad (6.1)$$

berechnet werden, wobei I_{th} der Intensitätsschwellwert und $I(r, z)$ die Intensitätsverteilung eines Gauß-Strahls sind, indem die Gleichungen $I_{th} = I(r, 0)$ und $I_{th} = I(0, z)$ nach r und z gelöst werden. Die Intensität des Maximums I_0 ist proportional zur mittleren Laserleistung \bar{P} und das führt zu den folgenden Abhängigkeiten zwischen der Größe eines Voxels und der mittleren Laserleistung

$$\bar{P} = a \exp(br^2) \quad \text{und} \quad \bar{P} = c + dz^2. \quad (6.2)$$

Der Anstieg der Laserleistung in Abbildung 6.6 stimmt gut mit dem angepassten Verlauf dieser beiden Funktionen überein.

Darüber hinaus ist eine Laserleistung von 11 µW ausreichend um einen die Scaffolds umschließenden Ring mit dem 405 nm Laser auszuhärten. Dieser Ring bildet eine äußere Hülle um die Gerüststrukturen und wird hinzugefügt um das Zellwachstum auf den Strukturen während Zellwachstumsversuchen zu verbessern und leichter zu kontrollieren. Seine Aufgabe ist es die Zellen in der Nähe der Gerüste zu halten um Zellsuspension zu sparen und ein schnelleres Wachstum in einer eingeschränkten Umgebung zu bewirken. Abbildung 6.7 zeigt eine komplette Struktur mit einem kippbaren Digitalmikroskop⁵ bei unterschiedlichen Vergrößerungen aufgenommen. Die verschiedenen Porengrößen der Gerüste sind bei stärkerer Vergrößerung sichtbar (siehe Abbildung 6.7 (b)). Für weitere Untersuchungen werden die Proben mit einer 15 nm dicken Goldschicht beschichtet um diese mit einem Tisch-Elektronenmikroskop⁶ zu

⁵ Leica, DVM6

⁶ Phenom-World, Phenom Pro X

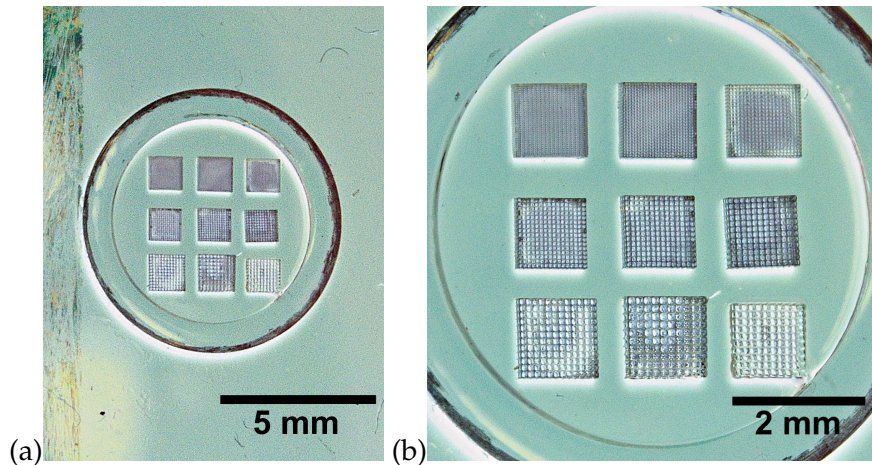


Abbildung 6.7: Gerüststrukturen in einer äußeren Hülle bei unterschiedlichen Vergrößerungen.

analysieren. Ein Übersichtsbild von Gerüststrukturen mit Porengrößen von $30\text{ }\mu\text{m}$ bis $110\text{ }\mu\text{m}$ wird in Abbildung 6.8 (a) dargestellt und veranschaulicht die durch Zwei-Photonen-Polymerisation erzielte hohe Auflösung bei der Herstellung von kleineren Porengrößen. Abbildung 6.8 (b) zeigt anhand einer Struktur mit $80\text{ }\mu\text{m}$ großen Poren, dass die Seitenwände der Gerüststrukturen geöffnet sind. Dies wird durch eine Strahlaufweitung erreicht und wird eine Perfusion der Zellen während Zellwachstumsversuchen ermöglichen. Dies ist eine Verbesserung gegenüber den Ergebnissen in Kapitel 5, in welchem an Scaffolds mit geschlossenen Seitenwänden erfolgreich horizontales und vertikales, inneres und äußeres Zellwachstum demonstriert wurde.

Die Produktionszeit der durch einen Single-line single-pass Schreibprozess realisierten Gerüststrukturen ist verglichen mit anderen kürzlich veröffentlichten Arbeiten [51, 151] zu mit Laserdirektschreiben hergestellten Gerüststrukturen erheblich kürzer. Außerdem verringern größere Poren aufgrund des kürzeren Verfahrenswegs während der Fertigung die Herstellungsdauer und erhöhen das produzierte Volumen pro Minute mit einem Faktor von vier, wie die gemessenen Zeitwerte für Strukturen mit unterschiedlicher Porengröße in Abbildung 6.9 verdeutlichen. Dieser Faktor kann durch die Betrachtung von zwei Porengrößen, Porengröße a und Porengröße $b = 2a$ erklärt werden. Anstatt von einem Kreis mit dem Durchmesser $b = 2a$ pro Seitenwand einer Pore, gibt es bei der kleineren Porengröße vier Kreise mit dem Durchmesser a . Dies führt zu einem doppelt so langen Verfahrensweg für die kleinere Porengröße. Zusätzlich muss für ein vollständiges Gerüst mit der halben Porengröße (a anstelle von $b = 2a$) ein zweites Gerüst zwischen den Poren mit der Porengröße b platziert werden, um in allen drei Raumrichtungen korrekt verbundene Poren mit einer Porengröße a zu erhalten. Dies führt erneut zu einem Faktor von zwei und insgesamt zu einem Faktor von vier. Der gemessene Wert für die kleinsten Poren von $30\text{ }\mu\text{m}$ weicht von dem erwarteten Wert ab. Eine Begründung hierfür ist der größer werdende Unterschied zwischen definierter und tatsächlicher Position und Geschwindigkeit der beweglichen Achsen für kürzere Beschleunigungswege bedingt durch kleinere Porengrößen.

Ein wichtiger Punkt ist die Zeitersparnis bei der Erzeugung des Rings mit einem Innendurchmesser von 6 mm und einer Breite von etwa 1 mm aufgrund der Verwen-

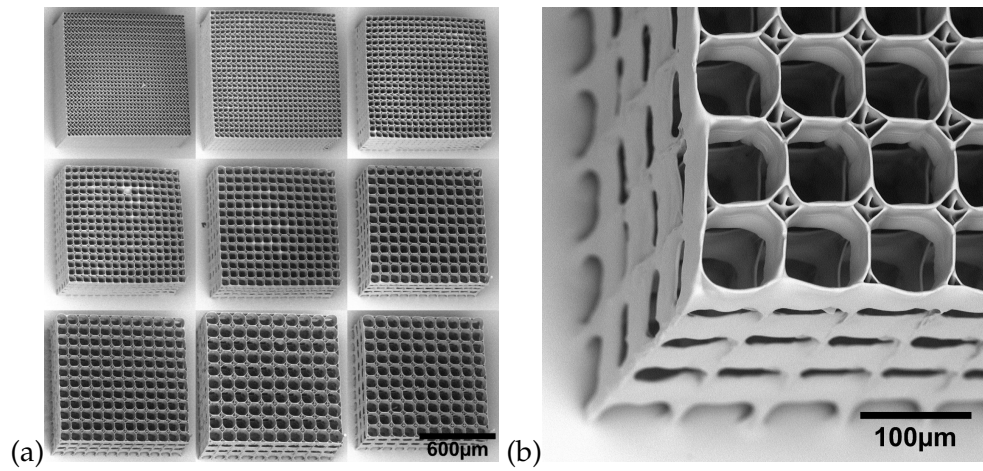


Abbildung 6.8: REM-Aufnahmen von (a) Gerüststrukturen mit den untersuchten Porengrößen von 30 µm bis 110 µm und (b) die offenen Seitenwände einer Struktur mit 80 µm Porengröße.

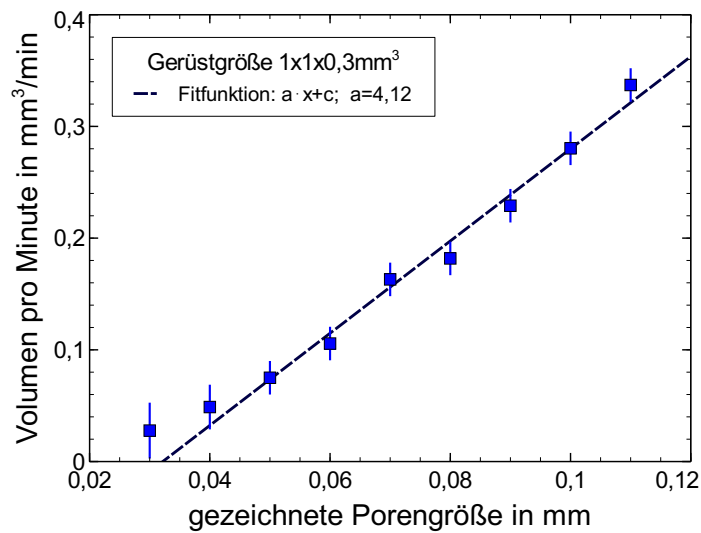


Abbildung 6.9: Produziertes Volumen pro Minute in Abhängigkeit von der Porengröße.

dung von linearer Absorption an Stelle von nichtlinearer Zwei-Photonen-Absorption. Für den Zwei-Photonen-Prozess charakteristisch ist ein punktuelltes Aushärten des Materials. Das bedeutet, dass eine etwa $700\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schicht aus OrmoComp[®] zu dick ist, um bei einmaligem Abfahren mit dem 515 nm Laser durchgehend polymerisiert zu werden. Daher muss die Schicht in mehrere Ebenen (circa 50 Ebenen mit dem ausgewählten Objektiv) aufgeteilt werden. Im Vergleich dazu wird der 405 nm Laser mit einem Eingangsstrahldurchmesser von nur 1 mm durch das Objektiv fokussiert und somit die NA reduziert. Dies führt zu einer breiteren Intensitätsverteilung und einem höheren Aspektverhältnis. Die komplette Schicht wird somit ohne eine Aufteilung in mehrere Ebenen ausgehärtet. Zudem muss der Ring aus zehnmal mehr Kreisen aufgebaut werden, um eine Überlappung nebeneinander ausgehärteter Kreise bei der höheren lateralen Auflösung der Zwei-Photonen-Polymerisation sicherzustellen. Dies führt zu einem beachtlichen Unterschied in der Herstellungsdauer beider Prozesse von 60 Stunden für Zwei-Photonen-Polymerisation mit dem 515 nm Laser und nur 7 Minuten für lineare Absorption des 405 nm Lichts und verdeutlicht den Vorteil von einer Vereinigung beider Prozesse in einem System.

6.2.3 Fluidisches System

Das Potenzial einer kombinierten additiven Herstellung mit linearem und nichtlinearem Absorptionsprozess wird des Weiteren durch die Prüfung des Konzepts für fluidische Systeme anhand eines Kanals mit integriertem Filter demonstriert. Ein Kanal wird mittels UV-Licht in einer Schicht aus fotosensitivem Material generiert, indem das obere und untere Substrat durch Kanalwände miteinander verbunden werden. Zusätzlich wird ein Filter durch die Anwendung von Zwei-Photonen-Polymerisation in den Kanal geschrieben. Die Fertigungsdauer für einen kleinen Filter mit einer Gesamtgröße von $1,6 \times 0,4 \times 0,96\text{ mm}^3$ und $80\text{ }\mu\text{m}$ großen Poren beträgt 3,4 Minuten und für einen 8 mm langen massiven Kanal 3,9 Minuten. Die Dichtigkeit eines hergestellten Kanals wird mit einer Rhodamin B Lösung in destilliertem Wasser untersucht und in Abbildung 6.10 (a) illustriert. Die Rhodamin B Lösung fließt durch den Kanal und durchdringt den Filter ohne sichtbare undichte Stelle im Kanal. Ein verbesserter Kontrast zwischen transparentem fluidischen System und dessen Umgebung wird dadurch erzielt, dass das obere Deckglas vorsichtig entfernt wird und das System anschließend mit Rhodamin B Lösung eingefärbt wird. In Abbildung 6.10 (b) wird ein eingefärbter Kanal mit Filterstruktur gezeigt. Die Erzeugung von kompakten Kanälen und die Option innerhalb von einem Prozessschritt funktionale Merkmale in diese zu integrieren, wie anhand des Filters demonstriert wird, befähigt den hybriden Prozess aus linearer und nichtlinearer Absorption Systeme zielgerichtet für fluidische Anwendungen herzustellen.

6.3 ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde ein hybrides Verfahren erarbeitet, welches Zwei-Photonen-Polymerisation und Stereolithografie in einem System und gemeinsamen Herstellungsverfahren vereint. Dadurch wird eine hoch aufgelöste und schnelle Anfertigung von makroskopischen dreidimensionalen Objekten möglich. Ergebnisse in der Realisierung eines solchen

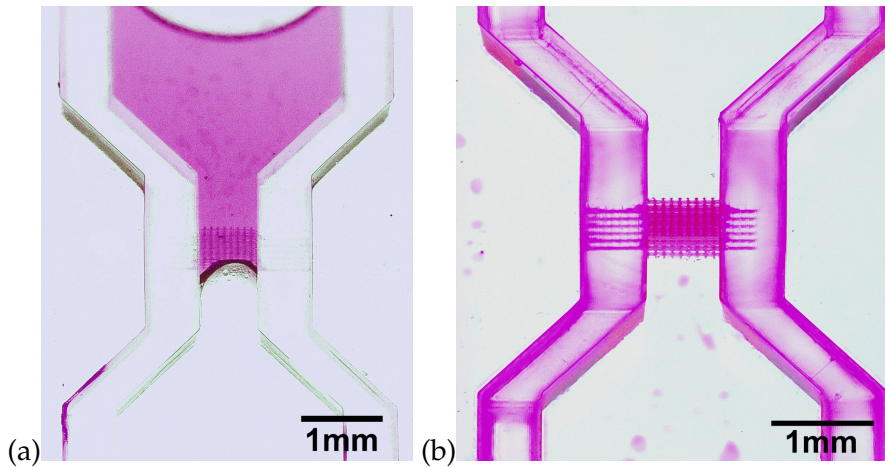


Abbildung 6.10: (a) Kanal gefüllt mit Rhodamin B Lösung und (b) eingefärbtes System nach dem Entfernen des oberen Deckglases.

Verfahrens wurden durch ein Lasersystem, welches einen 515 nm Ultrakurzpulslaser für Zwei-Photonen-Polymerisation mit einem 405 nm Laser für Stereolithografie kombiniert, erzielt. Es wurden präzise Gerüststrukturen mit unterschiedlichen Porengrößen und offenen Seitenwänden durch Laserdirektschreiben generiert. Diese Strukturen sind von einem durch den UV-Laser ausgehärteten Ring umgeben. Die Prozessdauer für den Ring wurde durch die Verwendung eines linearen Absorptionsprozesses signifikant von 60 Stunden für Zwei-Photonen-Polymerisation auf 7 Minuten reduziert. Eine Antihafbeschichtung verhinderte zudem erfolgreich, dass der Ring nicht am oberen Deckglas anhaftet. Als weiteres Anwendungsbeispiel wurde ein Kanal mit integriertem Filter zwischen zwei Deckgläsern angefertigt. Eine Dichtigkeitsprüfung des Kanals mit Rhodamin B Lösung und der eingefügte Filter veranschaulichen die Anwendbarkeit des hybriden Prozesses zur Fertigung fluidischer Systeme. Aufbauend auf den aktuellen Ergebnissen lässt sich eine erweiterte Herstellungsmethode umsetzen, welche ein dreidimensionales Objekt aus mehreren Schichten aufbaut, wobei innerhalb jeder Schicht gröbere Strukturen durch Stereolithografie und feinere Strukturen durch Laserdirektschreiben mittels Zwei-Photonen-Polymerisation geformt werden.

MIKRONADELN

Ein weiteres Anwendungsgebiet für Laserdirektschreiben mittels Zwei-Photonen-Polymerisation im medizintechnischen Bereich ist die Herstellung von Mikronadeln. Diese haben ein enormes Potenzial im Vergleich zu normalen Spritzen als Medizinprodukt für eine einfache, akkurate und schmerzfreie Medikamentengabe gut angenommen zu werden. Sie bieten eine Alternative zur subkutanen Medikation, welche aktuell die bevorzugte Methode in der Behandlung von Diabetes ist [179, 180]. Außerdem können intradermale Mikronadelpflaster die Anwendung von Impfungen [180, 181], vor allem der regelmäßigen Grippeimpfung, revolutionieren und in der Forschung zu Krebstherapien eine wichtige Rolle spielen [182, 183]. In Kombination mit mikrofluidischen Systemen können Mikronadeln zudem durch Entnahme von Flüssigkeiten als Plattform für schnelle und einfache Lab-on-a-Chip Diagnostik dienen [83, 184]. Für all diese Anwendungen zeichnen sich mikronadelbasierte Lösungen dadurch aus, dass sie minimal invasiv sind und das Risiko für Entzündungen und Infektionen minimieren [179, 185]. Patienten, vor allem Kinder [183, 186], profitieren von solchen schmerzlosen [187] und leicht zu handhabenden Systemen zur Verbesserung der medizinischen Versorgung [188].

Im Folgenden wird ein hybrider Ansatz präsentiert, welcher mittels Laserdirektschreiben gefertigte Mikronadeln mit mikrofluidischen Kanälen, generiert durch ultrakurze Laserpulse, kombiniert. Hohle Mikronadel-Arrays werden durch Zwei-Photonen-Polymerisation hergestellt und einem Druckversuch unterzogen. Zwei unterschiedliche kegelstumpfförmige Nadeltypen geben Aufschluss über die mechanische Festigkeit von Nadeln aus OrmoComp[®]. Als fluidisches System werden mit einem Ultrakurzpulslasersystem direkt in PMMA-Plättchen erzeugte dreidimensionale Mikrokanäle verwendet. Die vertikalen Kanäle erlauben ein Anbringen von Mikronadeln an das fluidische System. Eine ausführliche Untersuchung zum Einfluss der Veränderung der Pulslänge und Repetitionsrate auf die Zwei-Photonen-Polymerisation wird durchgeführt mit dem Ziel Mikronadeln mit der gleichen Repetitionsrate und Pulslänge wie die Mikrokanäle zu erstellen. Dadurch wird der Vorteil eines Verfahrens mit gemeinsamem Lasersystem adressiert. Eine Prüfung des vorgestellten Konzepts durch einen Durchflusstest mit einer Rhodamin B Lösung in destilliertem Wasser veranschaulicht, dass die Kombination aus Mikronadeln und Mikrokanälen für Flüssigkeitsinjektionen und Anwendungen mit Entnahme von Flüssigkeit geeignet ist.

7.1 HERSTELLUNG VON MIKRONADELBASIERTEN SYSTEMEN

In der Literatur lassen sich mehrere anwendungsspezifische Mikronadeltypen [189] hergestellt durch unterschiedliche Verfahren finden. Massive [190], beschichtete [191] und sich auflösende [192, 193] Mikronadeln eignen sich hervorragend um Wirkstoffe nach der Perforation über ein Pflaster, direkt von der Mikronadelbeschichtung oder auflösenden Nadeln in die Haut abzugeben. Darüber hinaus ermöglichen hohle Mikronadeln sowohl eine Medikamentengabe [181] als auch eine Entnahme von Flüssigkeiten [184]. Die Form eines Kegels [184, 193, 194] oder einer Pyramide [8, 83] dienen oft als Basis für diesen Nadeltyp. Nadelkonzepte mit zur Symmetrieachse versetzten Löchern verhindern Verstopfung nach dem Eindringen in die Haut [195] und Nadelformen, welche den Rüssel von Moskitos imitieren, sind ein Ansatz um die Eindringkraft zu reduzieren [196, 197]. Laserdirektschreiben mittels Zwei-Photonen-Absorption ist eine ausgezeichnete Methode um diese Mikronadeln zu produzieren [194]. Im Gegensatz zu anderen Fertigungstechniken wie Ätzverfahren [184, 198] oder Mikrospritzgießen [82, 199] können hiermit dreidimensionale Nadeln mit beliebiger Form und hoher Auflösung in nur einem Prozessschritt erzeugt werden.

Für eine akkurate Medikamentenabgabe und Lab-on-a-Chip Diagnostik werden Mikronadel-Arrays mit einem zusätzlichen mikrofluidischen System kombiniert. Die Fertigung dieser Systeme ist normalerweise umständlich und bedarf mehrere Prozessschritten (unter anderem Ätz- und Verbindungsschritte) [83–86]. Alternativ verwirklichen einige Gruppen weniger komplexe Ansätze mit offenen Kanälen [199, 200]. In dieser Arbeit wird ein Prozess basierend auf Ultrakurzpulslasertechnologie gewählt um mikrofluidische Kanäle [201] direkt in PMMA-Plättchen zu generieren.

7.1.1 *Laserdirektschreiben von Mikronadeln*

Die Mikronadeln werden primär mit dem in Abschnitt 3.1 näher erläuterten Aufbau geschrieben. Dabei kommt der Laser mit einer Wellenlänge von 515 nm, einer Pulslänge von 267 fs und einer Repetitionsrate von 55 MHz zum Einsatz. Für weiterführende Untersuchungen wird der zusätzlich eingebaute Ultrakurzpulslaser mit Zusatzmodul für Frequenzverdopplung (siehe Abschnitt 3.3.2) verwendet. Dieser liefert Lichtpulse bei einer Wellenlänge von 515 nm mit variierbaren Pulsängen von 345 fs bis 2,8 ps und einstellbarer Repetitionsrate von 100 kHz bis 10 MHz. Zum Anfertigen der Mikronadeln wird ein aufgeweiteter Lichtstrahl von einem der beiden Laser durch ein 20x Objektiv mit einer NA von 0,5¹ oder alternativ ein 63x Objektiv mit einer NA von 0,75² in eine Schicht OrmoComp[®] fokussiert. Das bereits für die Gerüststrukturen herangezogene Hybridpolymer eignet sich auch hier, da es ausreichend hart ist um die Stratum Corneum Hautschicht zu durchdringen [194] und auf Biokompatibilität getestet wurde [10, 164].

Die Nadeln werden entweder auf einem Deckglas mit lasergebohrten Löchern oder einem präparierten PMMA-Plättchen mit Mikrokanälen, wie in Abbildung 7.1, aufgebaut. Eine flache Oberfläche wird durch ein dünnes Deckglas über dem fotosensitiven Material erreicht und verhindert zusätzliche Aberration. Die Proben werden auf einer

¹ ZEISS, EC Epiplan-Neofluar

² ZEISS, LD Plan-Neofluar

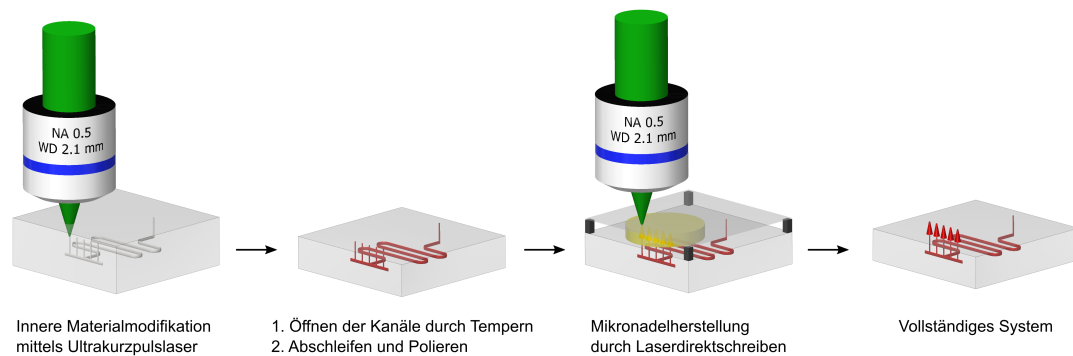


Abbildung 7.1: Fertigungsdiagramm³ zur Veranschaulichung der kombinierten Herstellung von innen liegenden Mikrokanälen und Mikronadeln erzeugt durch Zwei-Photonen-Polymerisation.

Platte platziert, welche durch eine Plattform senkrecht zum eingehenden Laserstrahl zu bewegen ist. Um echte dreidimensionale Strukturen herzustellen ist das Objektiv entlang der Strahlrichtung durch eine weitere Plattform positionierbar. Die im Aufbau integrierte CCD Kamera eignet sich dafür um die Löcher und Öffnungen der vertikalen Kanäle zu identifizieren und die konstruierten Mikronadeln korrekt auf diesen Öffnungen zu platzieren. Der gesamte Prozess, welcher geschriebene Mikronadeln mit generierten Mikrokanälen verbindet, ist in Abbildung 7.1 veranschaulicht.

7.1.2 Erzeugen von Kanälen

Mikrokanäle werden mittels eines laserinduzierten Verfahrens in zwei Prozessschritten, welche in Abbildung 7.1 beschrieben werden, in einem PMMA-Plättchen erzeugt. Zunächst werden die Proben mit einem fokussierten Ultrakurzpuls-Laser mehrfach abgefahren um im Bereich des Fokus eine ausreichende nichtlineare Absorption auszulösen. Dadurch lassen sich definierte dreidimensionale Geometrien durch Verfahren des Fokus im Material bilden. Das belichtete PMMA hat, wie in Baum et al. [202] gezeigt wurde, eine geringere thermische Stabilität verglichen mit unbehandeltem Material. In einem dem Laserprozess angeschlossenen Tempern der Plättchen auf einer Heizplatte zwischen zwei Glassubstraten bei 200 °C für 30 Sekunden wird das modifizierte Material degeneriert und innen liegende Mikrokanäle geformt. Dabei ist anzumerken, dass vor dem Erhitzen keine Mikrokanäle erkennbar sind und ihr Entstehen eindeutig mit dem Tempern verknüpft ist. Eine detaillierte Beschreibung des Prozesses ist in Roth et al. [201] zu finden.

Für den Laserprozess wird ein Ytterbium-dotierter Kalium-Gadolinium-Wolframat (Yb:KGW) Ultrakurzpuls-Laser⁴ mit einer Wellenlänge von 515 nm, einer Pulslänge von 450 fs und einer Repetitionsrate von 61 kHz eingesetzt. Der Laserstrahl wird durch ein 20x Objektiv mit einer NA von 0,5⁵ fokussiert. Das Objektiv ist an einer entlang der

³ von Gian-Luca Roth, Hochschule Aschaffenburg

⁴ Light Conversion, Pharos-10-600

⁵ ZEISS, EC Epiplan-Neofluar

Laserstrahlrichtung beweglichen Plattform⁶ befestigt und die Proben sind durch eine weitere Plattform⁷ in der Ebene senkrecht zum Objektiv positionierbar. Horizontale Mikrokanäle werden mit einer Schreibgeschwindigkeit von 20 mm/s und vertikale Kanäle mit einer Geschwindigkeit von 10 mm/s generiert.

7.1.3 *Anfertigung eines kombinierten Systems*

Für ein mikrofluidisches System aus Mikronadeln und Mikrokanälen werden die PMMA-Chips mit innen liegender dreidimensionaler Kanalarchitektur zunächst abgeschliffen und poliert, um die vertikalen Kanäle zu öffnen. Anschließend werden die Proben in einem Ultraschallbad für 10 Minuten gereinigt, um die Mikrokanäle von Rückständen zu befreien. Bevor OrmoComp[®] auf die derart präparierten PMMA-Chips aufgetragen wird, werden alle weiteren Öffnungen für das spätere Anschließen der Flüssigkeitszufuhr vorübergehend verschlossen um das Einlaufen des Polymers in die Kanäle zu reduzieren. Mikronadeln mit einem Basisradius von 175 μm , einem Spitzenradius von 25 μm , einer Höhe von 400 μm und 400 Windungen werden mittig auf den dafür vorgesehenen Kanalöffnungen platziert. Dafür kommen eine Laserleistung von 12 mW, eine Repetitionsrate von 10 MHz, eine Pulslänge von 540 fs, eine Schreibgeschwindigkeit von 5 mm/s und das 63x Objektiv zum Einsatz. Das nicht ausgehärtete Material wird vorsichtig mit destilliertem Wasser abgespült, um die PMMA-Chips davor zu bewahren von OrmoDev oder Isopropanol angegriffen zu werden.

7.2 EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE ZUR ANWENDBARKEIT

Die angefertigten Mikronadeln und mikronadelbasierten mikrofluidischen Systeme werden bezüglich ihrer Eignung für medizintechnische Anwendungen untersucht. Ein Druckversuch liefert Informationen darüber, ob die Nadeln ausreichend stabil sind, um in die menschliche Haut eindringen zu können. Überdies wird die fluidische Funktionalität des kombinierten Systems durch einen Durchflusstest mit Rhodamin B Lösung überprüft. Durch Identifizieren von geeigneten Parametern für den Zwei-Photonen-Prozess bei der Repetitionsrate und Pulslänge zur Erzeugung von Mikrokanälen wird der gesamte Fertigungsprozess auf ein Lasersystem vereinfacht.

7.2.1 *Stabilität der Mikronadeln*

Ein Druckversuch an zwei kegelstumpfförmigen Nadeltypen auf Deckgläsern mit laser-gebohrten Löchern gibt Auskunft über die Stabilität der angefertigten Mikronadeln. 4 x 4 Arrays von schmalen Mikronadeln (mit einem Basisradius von 100 μm , einem Spitzenradius von 15 μm , einer Höhe von 300 μm und 500 Windungen) und 5 x 5 Arrays von breiten Mikronadeln (mit einem Basisradius von 187,5 μm , einem Spitzenradius von 20 μm , einer Höhe von 250 μm und 500 Windungen) werden hierfür mit dem Lasersystem aus Abschnitt 3.1, dem 63x Objektiv, einer mittleren Laserleistung von 13,5 mW und einer Schreibgeschwindigkeit von 5 mm/s erzeugt. Der Verfahrensweg zur Herstellung der Nadeln ist schematisch in Abbildung 7.2 dargestellt. Nach der Belich-

⁶ Aerotech, ANT95-50-L-Z

⁷ Aerotech, ANT130-XY

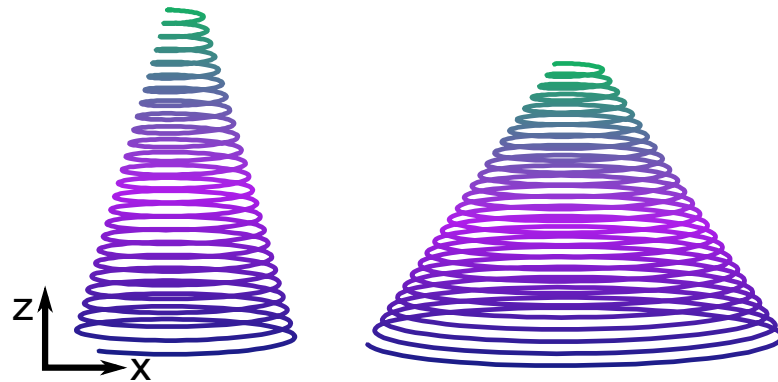


Abbildung 7.2: Verfahrenweg zur Herstellung schmäler und breiter Mikronadeln.

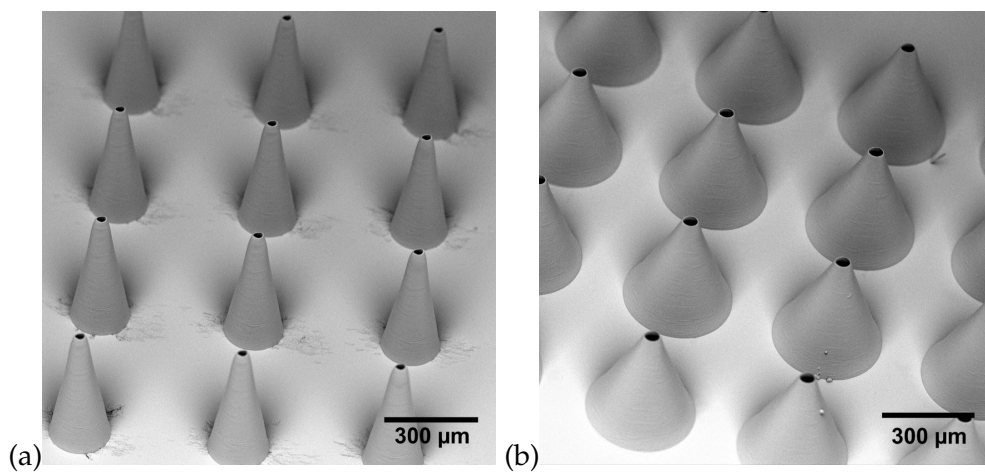


Abbildung 7.3: Detailansicht der (a) schmalen und (b) breiten Mikronadeln.

tung werden die Proben 10 Minuten bei 130°C auf einer Heizplatte erhitzt, 60 Minuten in OrmoDev entwickelt und anschließend bei 150°C für 3 Stunden auf einer Heizplatte ausgebacken. Abbildung 7.3 (a) zeigt eine Detailansicht der schmalen Mikronadeln und Abbildung 7.3 (b) eine Detailansicht der breiten Nadeln aufgenommen mit einem Elektronenmikroskop. Der Winkel der Wände [203] der Mikronadeln wird durch Messen der Nadelhöhe, des Spitzenradius und des Basisradius bestimmt und ist 11° für schmale Mikronadeln und 24° für breite Mikronadeln. Beide Nadeltypen bestätigen einen reproduzierbaren Herstellungsprozess und weisen eine exakte Positionierung über den lasergebohrten Löchern, verdeckt durch die Mikronadeln, auf.

Für den Druckversuch werden die Mikronadel-Arrays, jeweils acht Proben, nacheinander auf der Basisplatte eines mechanischen Testsystems⁸ befestigt und ein Druckstempel senkt sich von oben mit einer Geschwindigkeit von $0,015\text{ mm/s}$ auf die Mikronadeln ab. Für jede Probe wird die Kraft und die Auslenkung des Druckstempels gemessen und aufgenommen. Die daraus resultierende wirkende Kraft pro Nadeln wird in Abbildung 7.4 für jede der insgesamt 16 Proben dargestellt. Die Kurven starten mit einer konstanten Kraft, welche den Bereich wiedergibt bis der Druckstempel die

⁸ Bruker, UMT TriboLab

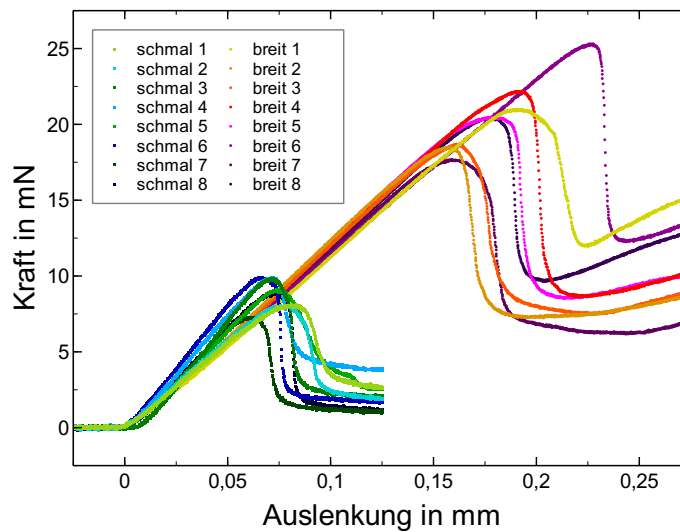


Abbildung 7.4: Ergebnisse der Druckversuche für eine einzelne Nadel.

Nadelspitze erreicht. Danach steigen die Kurven linear an. Dies weist auf eine lineare Verformung der Mikronadeln hin. Nach einem Maximum fallen die Kurven wieder ab und die Abweichung der Kurven des selben Nadeltyps nimmt zu. Das Maximum des schmalen Nadeltyps (7,3 - 9,9 mN) ist kleiner als das Maximum des breiten Typs (17,7 - 25,3 mN). Dies deutet auf eine höhere Stabilität von breiteren Mikronadeln hin. Ferner sind die Maxima ein Wendepunkt von elastischer zu plastischer Verformung. Dieses Verhalten wird durch die aufgenommenen Videos zu den Druckversuchen bestätigt. Auf den Videos lässt sich zudem beobachten, dass sich die Mikronadeln nach dem Zusammendrücken wieder aufrichten.

Entscheidend für medizinische Anwendungen ist, dass die Mikronadeln ohne abbrechen in die menschliche Haut eindringen können. Daher werden die gemessenen Kräfte, welchen die Mikronadeln im Druckversuch standgehalten haben, mit Ergebnissen zur benötigten Eindringkraft von Mikronadeln in die Haut verglichen. Doraiswamy et al. [160] führten Experimente mit Mikronadeln aus OrmoComp[®] durch und drückten diese gegen Schweinehaut. Nach den Versuchen wurden festgestellt, dass die Mikronadeln intakt und ohne Risse sind. Des Weiteren präsentieren Davis et al. [203] eine umfangreiche Studie zur Eindringkraft von Mikronadeln in menschliche Haut. Für Mikronadeln mit einem Spitzenradius von 30 bis 80 μm wurden Eindringkräfte von 0,08 bis 3,04 N gemessen. Das zugehörige Diagramm [203] deutet darauf hin, dass die Eindringkraft für die hier untersuchten Mikronadeln mit einem Spitzenradius von $(13 \pm 2) \mu\text{m}$ (schmale Nadeln) und $(21 \pm 2) \mu\text{m}$ (breite Nadeln) in einem Bereich um 5 mN liegt. Dies ist geringer als die während des Druckversuchs identifizierte maximale Kraft von 7,3 mN bis 9,9 mN für schmale Mikronadeln und 17,7 mN bis 25,3 mN für breite Mikronadeln. Roxhed et al. [204] konzipierten Mikronadeln mit einer scharfen Spitze und für einen runden Nadeltyp wurde eine Eindringkraft von etwas unter 10 mN pro Nadel angegeben. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass eine Eindringkraft von unter 10 mN ausreicht um die Haut zu durchdringen. Die scharfe Spitze der verwendeten Mikronadeln aufgreifend und das Potential des Laserdirektschreibens zur Herstellung beliebiger Formen ausnutzend werden Mikronadeln in Form einer

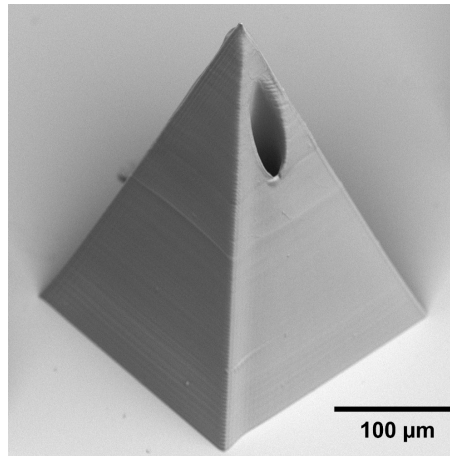


Abbildung 7.5: REM-Aufnahme einer Mikronadel in Form einer spitz zulaufenden Pyramide mit seitlichen Löchern.

spitz zulaufenden Pyramide und mit seitlichen Löchern angefertigt. Eine Aufnahme von einer Nadel mit dieser Form ist in Abbildung 7.5 illustriert. Die Fertigungszeit für eine solche Nadel beträgt 10 Minuten und dauert verglichen mit der Herstellung von Nadeln in Kegelstumpfform 10-mal länger. Dennoch können diese komplexeren Formen für zukünftige Bestrebungen die Eindringkraft zu reduzieren und die Injektion von Medikamenten zu optimieren von Interesse sein.

Insgesamt sind mittels Laserdirektschreiben produzierte Mikronadeln aus Ormo-Comp[®] aufgrund ihrer Stabilität, Biokompatibilität und der Möglichkeit beliebige Formen zu erzeugen eine gute Wahl für weiterführende mikronadelbasierte Forschung.

7.2.2 Funktionalität des mikrofluidischen Systems

Mit einem Durchflusstest wird überprüft, ob die Mikronadeln dicht an die Mikrokanäle angebracht sind und das System für mikrofluidische Anwendungen eingesetzt werden kann. Dafür wird eine Rhodamin B Lösung in destilliertem Wasser durch die Öffnungen für externe Flüssigkeitszufuhr in die Kanäle injiziert. Dieser Vorgang wird mit einem kippbaren Digitalmikroskop⁹ beobachtet und es werden Bilder aufgenommen. Eines der fertigen mikrofluidischen Systeme ist in Abbildung 7.6 (a) zu sehen. Es sind hierauf gut sichtbar vier Mikronadeln, die über vertikale Kanäle mit einem tiefer liegenden horizontalen Kanal verbunden sind, abgebildet. Die Funktionalität der Mikrokanäle wird in Abbildung 7.6 (b) durch ein verzweigtes Netzwerk von Kanälen gefüllt mit Rhodamin B Lösung belegt. Überdies wird dieselbe Lösung in ein kombiniertes System aus Mikrokanälen und Mikronadeln eingeleitet und die Flüssigkeit fließt, wie erwartet, über die Mikronadeln ab. In Abbildung 7.6 (c) wird eine Aufnahme von einer der Mikronadeln kurz nach dem gelungenen Durchflusstest gezeigt. Die Mikronadel ist durch das Rhodamin B pink gefärbt und im Mikrokanal befinden sich ebenfalls Reste der pinken Lösung. Diese Untersuchung unterstreicht das Potential von mit

⁹ Leica, DVM6

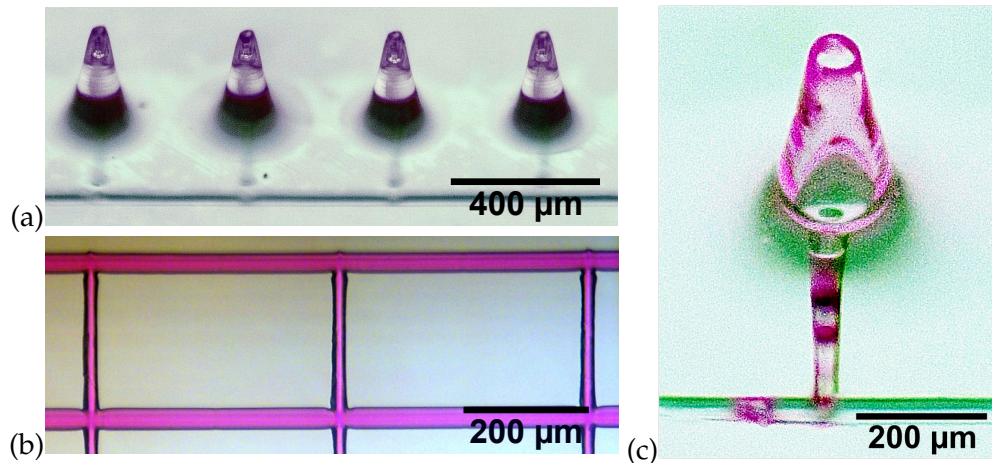


Abbildung 7.6: (a) Fluidisches System mit vier Mikronadeln, (b) Mikrokanal gefüllt mit Rhodamin B Lösung und (c) Mikronadel mit Rückständen der pinken Rhodamin B Lösung vom erfolgreichen Durchflusstest.

Ultrakurzpulslasern hergestellten mikronadelbasierten fluidischen Systemen für die Medikamentengabe und Flüssigkeitsabnahme.

7.2.3 Optimierung des Fertigungsprozesses

Für die Generierung der Mikronadeln und Mikrokanäle wurden bislang zwei separate Systeme verwendet. Diese unterscheiden sich hauptsächlich dadurch, dass verschiedene Ultrakurzpulslaser Anwendung finden. Durch eine Betrachtung des Einflusses der Pulslänge und Repetitionsrate auf die Zwei-Photonen-Polymerisation wird dieser Prozess auf den Laser zur Herstellung von Mikrokanälen angepasst.

Bereits für die Bestimmung der Absorptionsordnung in Abschnitt 4.2 wurde hergeleitet, dass ein vergleichbares Polymerisationsverhalten bei unterschiedlichen Repetitionsraten und Pulslängen zu erwarten ist, wenn Gleichung 4.5 und entsprechende Randbedingungen erfüllt werden. Dies ermöglicht die Berechnung einer Pulsleistung P_b für erfolgreiches Laserdirektschreiben mit einer Pulslänge τ_b und Repetitionsrate f_b , wenn eine geeignete Pulsleistung P_a für eine Pulslänge τ_a und Repetitionsrate f_a ermittelt wurde, die Absorptionsordnung bekannt ist und alle anderen Einflussfaktoren wie z. B. die Strahlform gleich bleiben. Ausgehend von passenden Laserleistungen, welche für eine Repetitionsrate von 10 MHz und eine Pulslänge von 540 fs durch Anfertigung von Mikronadeln definiert wurden, werden Leistungsbereiche für weitere Repetitionsraten und Pulslängen berechnet. Diese Leistungsbereiche werden gemäß Gleichung 4.5, wie in Abbildung 7.7 durch gestrichelte Linien dargestellt, durch zwei Geraden in einem doppel-logarithmischen Diagramm begrenzt. Außerdem wird in Abbildung 7.7 durch Punkte gekennzeichnet ein Überblick über die ausgewählten und erfolgreich getesteten Leistungswerte zur Herstellung von Mikronadeln gegeben. Diese Methoden zur Vorhersage von passenden Laserleistungen wird herangezogen um für einer Repetitionsrate von 61 kHz und Pulslänge von 450 fs, welche zur Generierung der Mikrokanäle dienen, einen entsprechenden Leistungsbereich zu berechnen. In einem

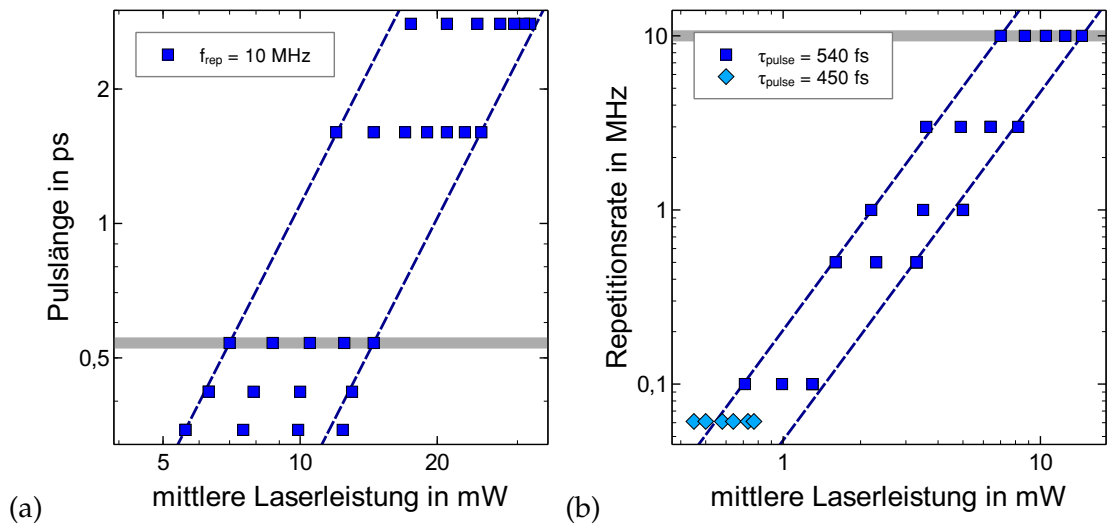


Abbildung 7.7: Die gestrichelten Linien kennzeichnen die berechneten Leistungsbereiche zur Herstellung von Mikronadeln ausgehend von den Resultaten für 10 MHz und 540 fs und die Punkte präsentieren erfolgreich getesteten Leistungswerte für (a) verschiedene Pulslängen und (b) verschiedene Repetitionsraten.

anschließenden Versuch Mikronadeln mit dem Ultrakurzpulslaser für die Mikrokanalherstellung zu schreiben werden mit den in Abbildung 7.7 (b) in hellblau eingetragenen Leistungswerten gute Resultate erzielt. Somit ist dieses Lasersystem ausreichend um sowohl Mikronadeln als auch Mikrokanäle zu erzeugen.

7.3 ZUSAMMENFASSUNG

In diesem Kapitel wurde ein mikrofluidisches System durch einen neuen Ansatz verwirklicht. Dazu wurde das Laserdirektschreiben von Mikronadeln mit innen liegenden mittels Ultrakurzpulslaser generierten Mikrokanälen kombiniert. Insbesondere wurden reproduzierbare Mikronadeln exakt auf den Öffnungen von vertikalen Mikrokanälen, welche ein verzweigtes Netzwerk mit horizontalen Kanälen bilden, positioniert. Eine fluidische Untersuchung mit Rhodamin B Lösung belegt die Anwendbarkeit eines solchen Systems für die Flüssigkeitsgabe und Flüssigkeitsentnahme. Des Weiteren legen die Ergebnisse der Druckversuche nahe, dass die aus OrmoComp[®] angefertigten Mikronadeln eine gute Wahl für medizinische Mikronadelanwendungen sind. Der Fertigungsprozess wurden dahin gehend optimiert, dass für beide Prozessschritte, Mikrokanäle generieren und Mikronadeln schreiben, ein einziger Laser ausreicht und somit von einem hybriden Ultrakurzpulslaserprozess gesprochen werden kann. Dies ist ein erheblicher Vorteil gegenüber anderen Herstellungsmethoden, welche eine Vielzahl von aufwendigen Prozessschritten benötigen, um ein mikrofluidisches System mit Mikronadeln zu erzeugen. Diese Ergebnisse bilden die Basis einer aussichtsreichen Methode zur Erschaffung mikronadelbasierter Lab-on-a-Chip Systeme für eine schnelle vor Ort Diagnostik.

ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Gesamtsystem zur Anfertigung medizintechnischer Funktionselemente realisiert, mit welchem sowohl Mikronadeln für ein mikrofluidisches System als auch makroskopische dreidimensionale Gerüststrukturen für Zellstudien mit humanen Fibroblasten erfolgreich hergestellt wurden. Dabei wurden auch hybride Verfahren entwickelt und der Herstellungsprozess deutlich optimiert.

8.1 ZUSAMMENFASSUNG

Zunächst wurde das Polymerisationsverhalten verschiedener Materialien bei einer Wellenlänge von 515 nm untersucht und dabei festgestellt, dass nicht alle Materialien das für eine Zwei-Photonen-Polymerisation typische Verhalten zeigen. Die Hybridpolymere OrmoCore, OrmoClad und OrmoComp[®] sind aufgrund einer einfachen Handhabung und guten Ergebnissen bei der Anfertigung von Teststrukturen am besten zur Herstellung von dreidimensionalen Strukturen geeignet. Zudem wurde für diese Materialien bei einer Wellenlänge von 515 nm die Absorptionsordnung durch Variation der Repetitionsrate und Pulslänge bestimmt. Alle drei Materialien absorbieren das Licht mit einer Absorptionsordnung von zwei und somit Zwei-Photonen-Absorption. Durch theoretische Berechnungen wurde darüber hinaus aufgezeigt, welchen Einfluss eine hohe numerische Apertur und die Polarisation des Strahls bei der Fokussierung auf die Intensitätsverteilung im Bereich des Fokus haben. Erste Strahlformungen und Strahlaufteilungen mit einem räumlichen Lichtmodulator weisen darauf hin, dass der Herstellungsprozess durch die Anwendung eines solchen Modulators weiter optimiert werden kann.

Es wurde gezeigt, dass stabile, periodische und reproduzierbare Gerüststrukturen mittels einer effizienten Single-line single-pass Schreibtechnik mit einer stark reduzierten Fertigungsdauer hergestellt werden können. Somit ist es möglich Gerüststrukturen mit einer Porengröße von 90 μm und einem Volumen von $3 \times 3 \times 0,2 \text{ mm}^3$ in nur 6,3 Minuten anzufertigen. Außerdem wurde die Adhäsion und Proliferation von Fibroblasten auf Gerüsten mit unterschiedlich großen Poren von 10 μm bis 90 μm vertiefend untersucht. Insbesondere war das Identifizieren einer passenden Nachbehandlung der geschriebenen Gerüste von Bedeutung, um sicherzustellen, dass keine Toxizität bei der Kultivierung von Zellen vorliegt. Es wurde Zelladhäsion, Zellproliferation und Zellüberleben drei, sechs und neun Tage nach Aussaat der Zellen nachgewiesen. Die Gerüste mit 90 μm großen Poren zeigen das beste Wachstum und sind nach neun Tagen dicht besiedelt. Das vertikale und horizontale, äußere und innere Zellwachstum

bestätigt, dass Gerüststrukturen aus OrmoComp[®] ohne die Unterstützung durch Proteinbeschichtungen für dreidimensionales Zellwachstum geeignet sind.

Darüber hinaus wurde ein hybrides Verfahren erarbeitet, welches Zwei-Photonen-Polymerisation und Stereolithografie in einem System und gemeinsamen Herstellungsverfahren vereint. Dadurch wird eine hoch aufgelöste und schnelle Anfertigung von makroskopischen dreidimensionalen Objekten möglich. Ergebnisse bei der Realisierung eines solchen Verfahrens wurden durch ein Lasersystem, welches einen 515 nm Ultrakurzpulslaser für Zwei-Photonen-Polymerisation mit einem 405 nm Laser für Stereolithografie kombiniert, erzielt. Es wurden präzise Gerüststrukturen mit unterschiedlichen Porengrößen und offenen Seitenwänden durch Laserdirektschreiben generiert. Diese Strukturen wurden von einem mit ultravioletttem Licht ausgehärteten Ring umgeben. Die Prozessdauer für den Ring wurde durch die Verwendung eines linearen Absorptionsprozesses signifikant von 60 Stunden für Zwei-Photonen-Polymerisation auf 7 Minuten reduziert. Eine Antihafbeschichtung verhinderte zudem erfolgreich, dass der Ring am oberen Deckglas anhaftet. Als weiteres Anwendungsbeispiel wurde ein Kanal mit integriertem Filter zwischen zwei Deckgläsern angefertigt. Eine Dichtigkeitsprüfung des Kanals mit Rhodamin B Lösung und der eingefügte Filter veranschaulichen die Anwendbarkeit des hybriden Prozesses zur Fertigung fluidischer Systeme.

Die Herstellung von medizintechnischen Funktionselementen wurde außerdem durch ein mikronadelbasiertes System demonstriert. Dazu wurde ein neuer Ansatz, welcher das Laserdirektschreiben von Mikronadeln mit innen liegenden mittels Ultrakurzpulslaser generierten Mikrokanälen kombiniert, verwirklicht. Insbesondere wurden reproduzierbare Mikronadeln exakt auf den Öffnungen von vertikalen Mikrokanälen, welche ein verzweigtes Netzwerk mit horizontalen Mikrokanälen bilden, positioniert. Eine fluidische Untersuchung mit Rhodamin B Lösung belegt die Anwendbarkeit eines solchen Systems für die Flüssigkeitsgabe und Flüssigkeitsentnahme. Des Weiteren legen die Ergebnisse von Druckversuche nahe, dass die aus OrmoComp[®] angefertigten Mikronadeln eine gute Wahl für medizinische Mikronadelanwendungen sind. Der Fertigungsprozess wurde dahin gehend optimiert, dass für beide Prozessschritte, Mikrokanäle generieren und Mikronadeln schreiben, ein einziger Laser ausreicht und somit von einem hybriden Ultrakurzpulslaserprozess gesprochen werden kann. Dies ist ein erheblicher Vorteil gegenüber anderen Herstellungsmethoden, welche eine Vielzahl von aufwendigen Prozessschritten benötigen um ein mikrofluidisches System mit Mikronadeln zu erzeugen.

8.2 AUSBLICK

Aufbauend auf den erzielten Ergebnissen werden in diesem abschließenden Abschnitt Anregungen für eine weitere Verbesserung des Herstellungsprozesses und die Weiterentwicklung der medizintechnischen Funktionselemente gegeben.

Der in das Gesamtsystem integrierte räumliche Lichtmodulator sollte zukünftig dafür eingesetzt werden den Herstellungsprozess von medizintechnischen Funktionselementen über die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse hinaus weiter zu optimieren.

Zudem sollte die Umsetzung eines hybriden Verfahrens aus Zwei-Photonen-Polymerisation und Stereolithografie weiterverfolgt werden. Ausgehend von der bereits ver-

wendeten Methode das fotoempfindliche Material in einer Schichtanordnung zu bearbeiten, ist eine Idee für zukünftige Anwendungen mit der Fokussieroptik in das fotoempfindliche Material einzutauchen. Dies wird vor allem bei der linearen Absorption dadurch eingeschränkt, dass das Material an der Fokussieroptik aushärtet. Eine zusätzliche Schutzhülle mit einem antihaftbeschichteten Fenster, um das Bearbeitungslicht durchzulassen, würde dies verhindern und eine Fertigung von beliebig hohen dreidimensionalen Strukturen ermöglichen. Zusätzlich zu der Schutzhülle ist dabei die Probenpräparation zu verändern. Ein Behälter gefüllt mit fotoempfindlichem Material, in welches mit der Schutzhülle eingetaucht werden kann, und einem auf dem Boden befestigten Substrat scheint dafür geeignet zu sein. Dadurch sollte sich eine erweiterte Herstellungsmethode umsetzen lassen, welche ein dreidimensionales Objekt aus mehreren Schichten aufbaut, wobei innerhalb jeder Schicht gröbere Strukturen durch Stereolithografie und feinere Strukturen durch Laserdirektschreiben mittels Zwei-Photonen-Polymerisation geformt werden.

Die Gerüststrukturen für Zellstudien mit humanen Fibroblasten sind eine vielversprechende Grundlage um für spezifische Anwendungen in der Gewebezüchtung geeignete dreidimensionale Strukturen zu generieren. In einer nächsten Versuchsreihe sollten Gerüststrukturen mit offenen Poren an den Seitenwänden und mit unterschiedlicher Porenform untersucht werden, um den Einfluss dieser beiden Faktoren zu analysieren.

Die vorgestellte Kombination von Mikrokanälen und Mikronadeln ist eine aussichtsreiche Methode zur Fertigung mikronadelbasierter Lab-on-a-Chip Systeme für eine schnelle vor Ort Diagnostik. Die Mikrokanäle wurden bislang in PMMA-Plättchen erzeugt. Ein Nachteil dieses Materials ist es, dass die Lösungsmittel, die zum Entwickeln und Reinigen der Mikronadeln verwendet werden, PMMA angreifen. Daher sollte ein anderer Kunststoff zur Generierung der Mikrokanäle in Betracht gezogen werden.

ANHANG

A.1 PROZESSFENSTER

Prozessfenster für OrmoCore und OrmoClad bei einer Wellenlänge von 515 nm und OrmoComp® bei einer Wellenlänge von 780 nm bestimmt mit der Teststruktur aus Abschnitt 4.1.2. Die mittlere Laserleistung wurde hierfür nach dem Objektiv mit einem Leistungsmessgerät aufgenommen.

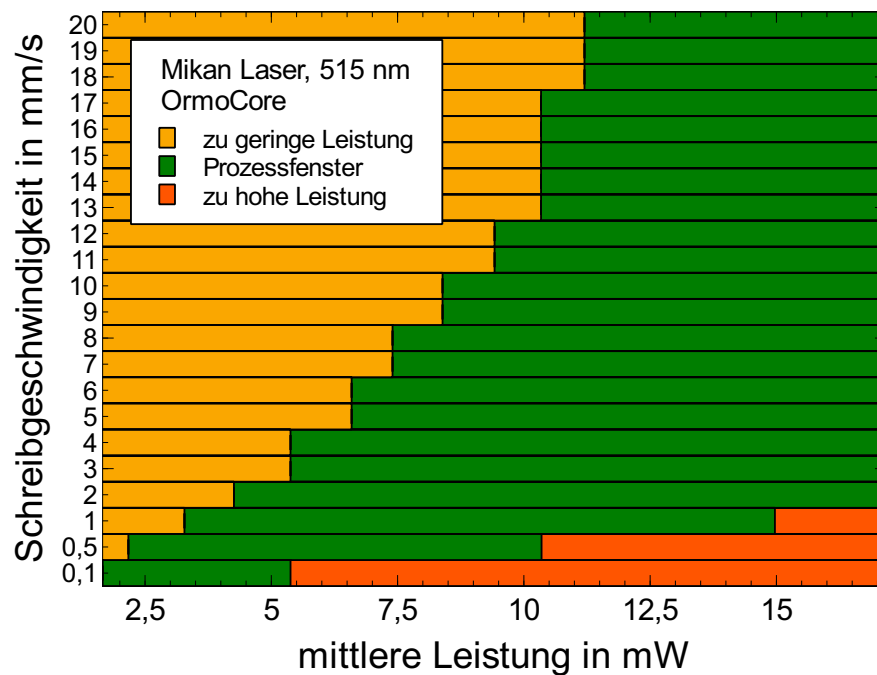


Abbildung 1.1: Prozessfenster für OrmoCore ermittelt mit Teststruktur.

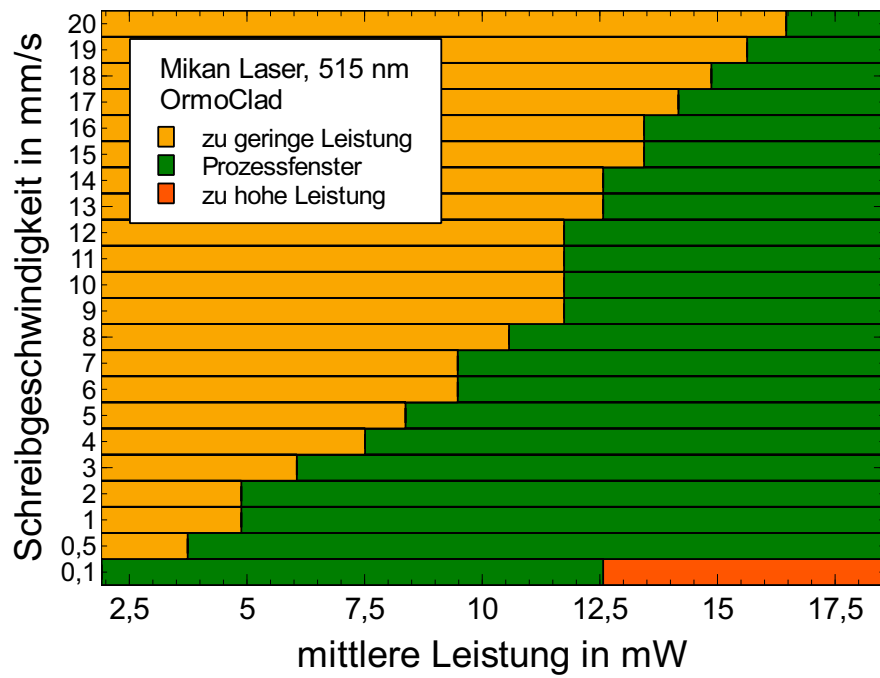


Abbildung 1.2: Prozessfenster für OrmoClad ermittelt mit Teststruktur.

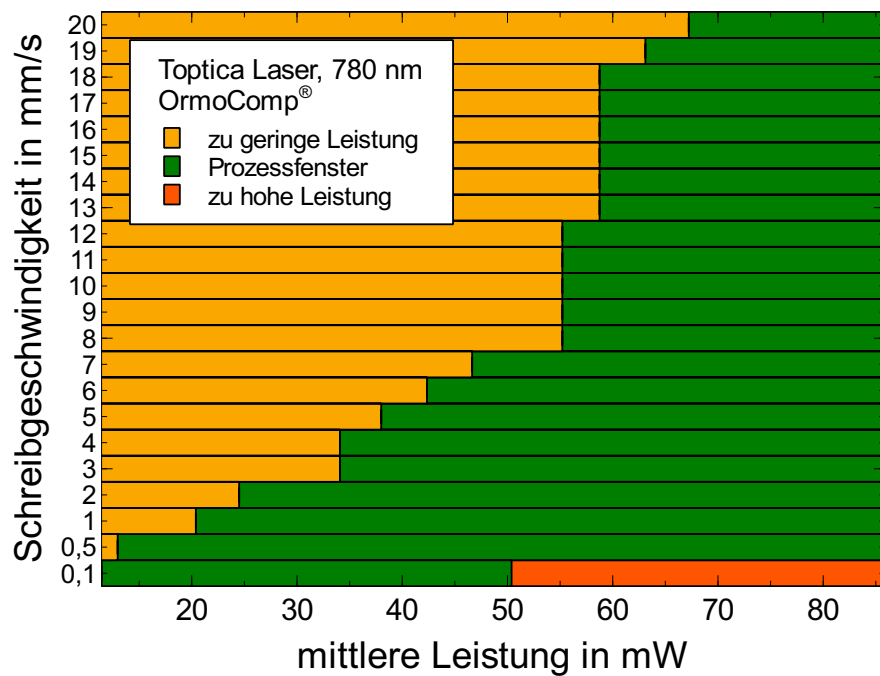
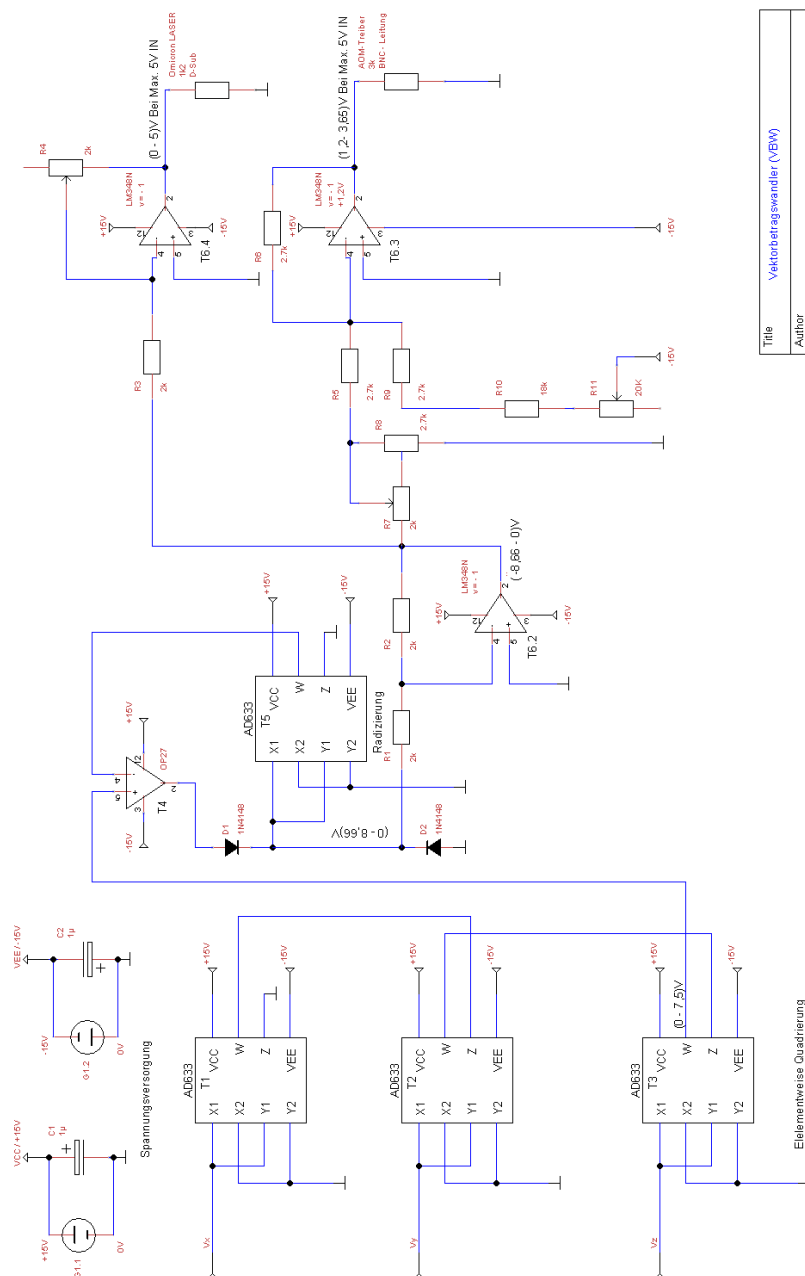


Abbildung 1.3: Prozessfenster für OrmoComp® ermittelt mit Teststruktur.

A.2 SCHALTPLAN

Schaltplan zur Umwandlung von geschwindigkeitsabhängigen analogen Spannungssignalen der Achsen des Nano-Positioniersystems in ein Spannungssignal proportional zum Vektorbetrag der Geschwindigkeiten.



Title	Vektorbetragswandler (VW)
Author	Kevin Rutsch (staat. gepr. Elektrotechniker)
File	./winRDocuments/TinyCAD/TPA_Annika_Alp.dsn
Revision	1.0
Date	04.03.2017
Sheets	1 of 1

Abbildung 1.4: Schaltplan zur Leistungsregulierung.

A.3 BETRAGSQUADRAT DER FELDKOMPONENTEN

Betragsquadrat der berechneten Feldkomponenten im Bereich des Fokus für linear und zirkular polarisierte Eingangsstrahlen und Vortex-Strahlen bei einer NA von 0,5 und 1,3 für eine eingestrahle Wellenlänge von 515 nm und einen Brechungsindex des Mediums, in das fokussiert wurde, von 1,5.

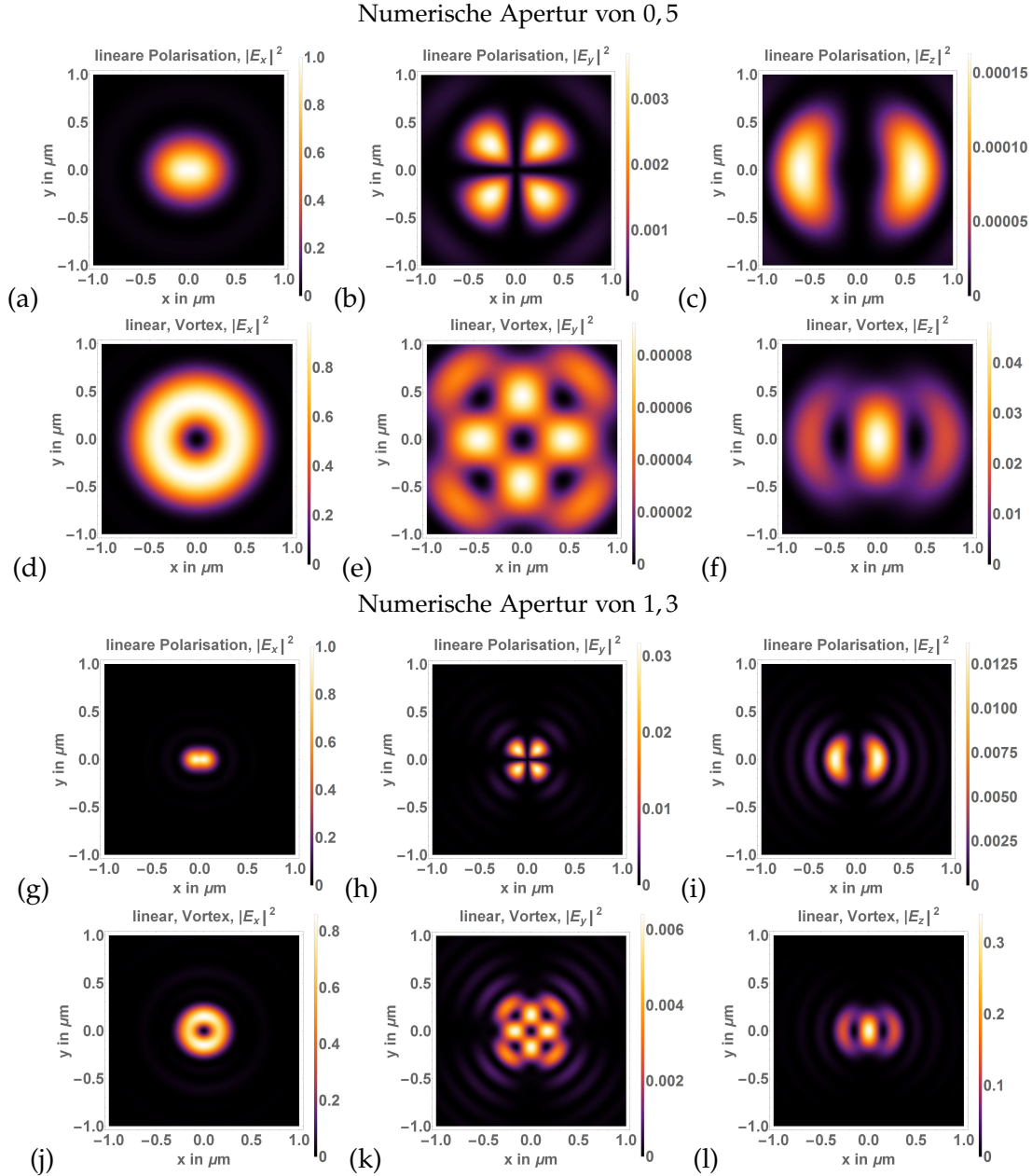
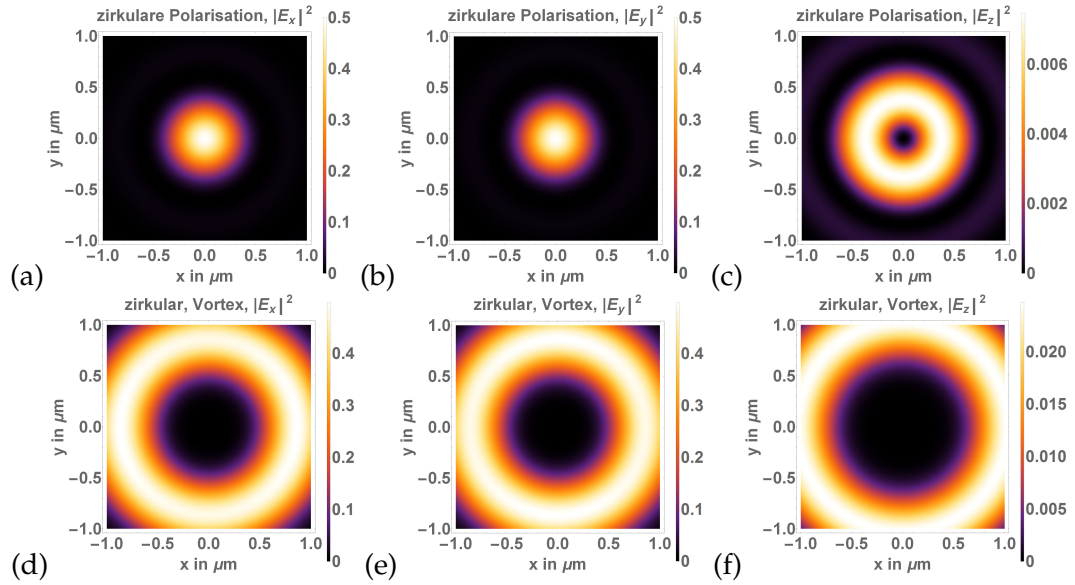


Abbildung 1.5: Betragsquadrat der einzelnen Feldkomponenten eines linear polarisierten Eingangsstrahls und Vortex-Strahls in der x-y-Ebene.

Numerische Apertur von 0,5



Numerische Apertur von 1,3

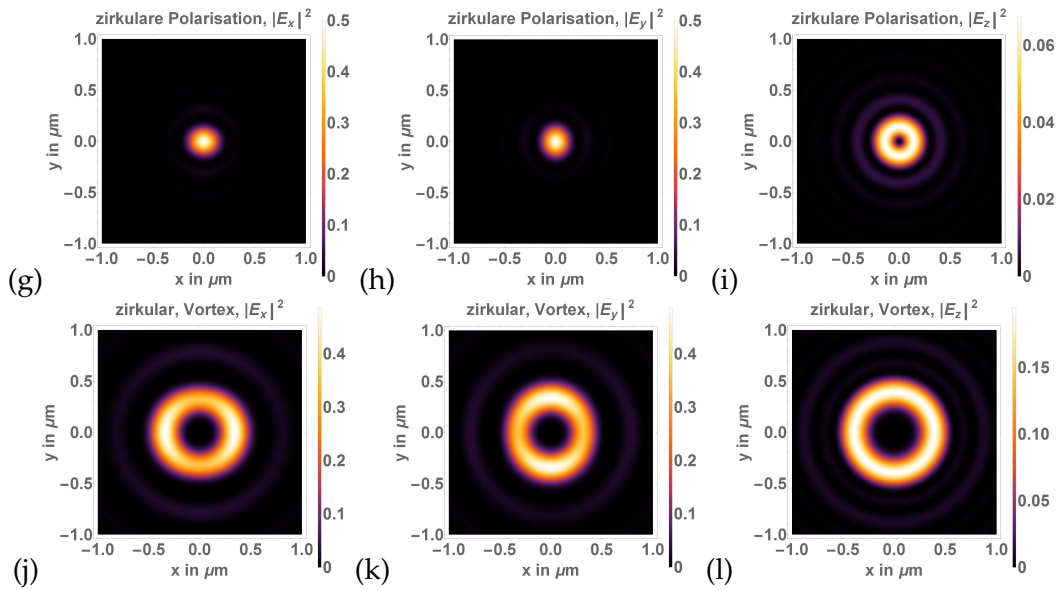


Abbildung 1.6: Betragsquadrat der einzelnen Feldkomponenten eines zirkular polarisierten Eingangsstrahls und Vortex-Strahls in der x-y-Ebene.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] D. Bratton, D. Yang, J. Dai, and C. Ober, *Polymers for Advanced Technologies*, **17**(2), 94–103 (2006). Recent progress in high resolution lithography.
- [2] L. Jonusauskas, S. Juodkazis, and M. Malinauskas, *Journal of Optics*, **20**(5), 053001 (2018). Optical 3D printing: bridging the gaps in the mesoscale.
- [3] M. Malinauskas, V. Purlys, M. Rutkauskas, A. Gaidukeviciute, and R. Gado-
nas, *Lithuanian Journal of Physics*, **50**(2), 201–207 (2010). Femtosecond visible
light induced two-photon photopolymerization for 3d micro/nanostructuring in
photoresists and photopolymers.
- [4] W. Xiong, Y. Zhou, X. He, Y. Gao, M. Masoud, L. Jiang, T. Baldacchini, and Y. Lu,
Light: Science & Applications, **1**, e6 (2012). Simultaneous additive and subtractive
three-dimensional nanofabrication using integrated two-photon polymerization
and multiphoton ablation.
- [5] A. Koroleva, A. Gill, I. Ortega, J. Haycock, S. Schlie, S. Gittard, B. Chichkov,
and F. Claeysens, *Biofabrication*, **4**(2), 025005 (2012). Two-photon polymerization-
generated and micromolding-replicated 3d scaffolds for peripheral neural tissue
engineering applications.
- [6] S. Gittard and R. Narayan, *Expert Review of Medical Devices*, **7**(3), 343–356 (2010).
Laser direct writing of micro-and nano-scale medical devices.
- [7] S. Gittard, A. Ovsianikov, B. Chichkov, A. Doraiswamy, and R. Narayan, *Expert
Opinion in Drug Delivery*, **7**(4), 513–533 (2010). Two-photon polymerization of
microneedles for transdermal drug delivery.
- [8] G. Ma and C. Wu, *Journal of Controlled Release*, **251**, 11–23 (2017). Microneedle,
bio-microneedle and bio-inspired microneedle: a review.
- [9] H. Jeon, H. Hidai, D. Hwang, K. Healy, and C. Grigoropoulos, *Biomaterials*,
31(15), 4286–4295 (2010). The effect of micronscale anisotropic cross patterns on
fibroblast migration.
- [10] A. Marino, C. Filippeschi, G. Genchi, V. Mattoli, B. Mazzolai, and G. Ciofani, *Acta
Biomaterialia*, **10**(10), 4304–4313 (2014). The osteoprint: A bioinspired two-photon
polymerized 3-d structure for the enhancement of bone-like cell differentiation.
- [11] T. Weiß, G. Hildebrand, R. Schade, and K. Liefelth, *Engineering in Life Sciences*,
9(5), 384–390 (2009). Two-photon polymerization for microfabrication of three-
dimensional scaffolds for tissue engineering application.
- [12] M. Göppert, *Naturwissenschaften*, **17**(48), 932–932 (1929). Über die Wahrscheinlich-
keit des Zusammenwirkens zweier Lichtquanten in einem Elementarakt.

- [13] M. Göppert-Mayer, *Annalen der Physik*, **401**(3), 273–294 (1931). Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen.
- [14] H. Haken and H. C. Wolf, *Molekülphysik und Quantenchemie*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 5 ed., 2006.
- [15] O. Kafri and S. Kimel, *Chemical Physics*, **5**(3), 488–493 (1974). Theory of two-photon absorption and emission second-order saturation effect.
- [16] J. Bhawalkar, G. He, and P. Prasad, *Reports on Progress in Physics*, **59**(9), 1041–1070 (1996). Nonlinear multiphoton processes in organic and polymeric materials.
- [17] L. Tutt and T. Boggess, *Progress in Quantum Electronics*, **17**(4), 299–338 (1993). A review of optical limiting mechanisms and devices using organics, fullerenes, semiconductors and other materials.
- [18] M. Gu, *Advanced optical imaging theory*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2000.
- [19] M. Born and E. Wolf, *Principles of optics*, Cambridge University Press, 7 ed., 1999.
- [20] H. Lin *Creation of Debye diffraction-limited multifocal arrays and their application in laser nanofabrication* PhD thesis, Swinburne University of Technology, (2013).
- [21] L. Yang, S. Ji, K. Xie, W. Du, B. Liu, Y. Hu, J. Li, G. Zhao, D. Wu, W. Huang, S. Liu, H. Jiang, and J. Chu, *Optics Express*, **25**(7), 8144 (2017). High efficiency fabrication of complex microtube arrays by scanning focused femtosecond laser bessel beam for trapping/releasing biological cells.
- [22] L. Yang, D. Qian, C. Xin, Z. Hu, S. Ji, D. Wu, Y. Hu, J. Li, W. Huang, and J. Chu, *Optics Letters*, **42**(4), 743 (2017). Two-photon polymerization of microstructures by a non-diffraction multifoci pattern generated from a superposed bessel beam.
- [23] K. Lee, R. Kim, D. Yang, and S. Park, *Progress in Polymer Science*, **33**, 631–681 (2008). Advances in 3D nano/microfabrication using two-photon initiated polymerization.
- [24] I. Wang, M. Bouriau, P. Baldeck, C. Martineau, and C. Andraud, *Optics Letters*, **27**(15), 1348 (2002). Three-dimensional microfabrication by two-photon-initiated polymerization with a low-cost microlaser.
- [25] X. Zhou, Y. Hou, and J. Lin, *AIP Advances*, **5**, 030701 (2015). A review on the processing accuracy of two-photon polymerization.
- [26] S. Wu, J. Serbin, and M. Gu, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **181**, 1–11 (2006). Two-photon polymerisation for three-dimensional microfabrication.
- [27] J. Serbin, A. Egbert, A. Ostendorf, and B. Chichkov, *Optics Letters*, **28**(5), 301–303 (2003). Femtosecond laser-induced two-photon polymerization of inorganic-organic hybrid materials for applications in photonics.
- [28] J. B. Mueller, J. Fischer, F. Mayer, M. Kadic, and M. Wegener, *Advanced Materials*, **26**(38), 6566–6571 (2014). Polymerization kinetics in three-dimensional direct laser writing.

- [29] A. Selimis, V. Mironov, and M. Farsari, *Microelectronic Engineering*, **132**, 83–89 (2015). Direct laser writing: Principles and materials for scaffold 3D printing.
- [30] K. Schafer, J. Hales, M. Balu, K. Belfield, E. Stryland, and D. Hagan, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **162**, 497–502 (2004). Two-photon absorption cross-sections of common photoinitiators.
- [31] Z. Li, N. Pucher, K. Cicha, J. Torgersen, S. Ligon, A. Ajami, W. Husinsky, A. Rosspeintner, E. Vauthey, S. Naumov, T. Scherzer, J. Stampfl, and R. Liska, *Macromolecules*, **46**(2), 352–361 (2013). A straightforward synthesis and structure-activity relationship of highly efficient initiators for two-photon polymerization.
- [32] J. Xing, X. Dong, W. Chen, X. Duan, N. Takeyasu, T. Tanaka, and S. Kawata, *Applied Physics Letters*, **90**(13), 131106 (2007). Improving spatial resolution of two-photon microfabrication by using photoinitiator with high initiating efficiency.
- [33] W. Haske, V. Chen, J. Hales, W. Dong, S. Barlow, S. Marder, and J. Perry, *Optics Express*, **15**(6), 3426–3436 (2007). 65 nm feature sizes using visible wavelength 3-D multiphoton lithography.
- [34] Z. Gan, Y. Cao, R. Evans, and M. Gu, *Nature Communications*, **4**(2061) (2013). Three-dimensional deep sub-diffraction optical beam lithography with 9 nm feature size.
- [35] P. E. Petrochenko, J. Torgersen, P. Gruber, L. A. Hicks, J. Zheng, G. Kumar, R. J. Narayan, P. L. Goering, R. Liska, and J. Stampfl, *Advanced Healthcare Materials*, **4**(5), 739–747 (2015). Laser 3D printing with sub microscale resolution of porous elastomeric scaffolds for supporting human bone stem cells.
- [36] M. Malinauskas, D. Baltriukiene, A. Kraniauskas, P. Danilevicius, R. Jarasiene, R. Sirmenis, A. Zukauskas, E. Balciunas, V. Purlys, R. Gadonas, V. Bukelskiene, V. Sirvydis, and A. Piskarskas, *Applied Physics A*, **108**(3), 751–759 (2012). In vitro and in vivo biocompatibility study on laser 3D microstructurable polymers.
- [37] S. Maruo, O. Nakamura, and K. S. letters, *Optics Letters*, **22**(2), 132–134 (1997). Three-dimensional microfabrication with two-photon-absorbed photopolymerization.
- [38] C. LaFratta and T. Baldacchini, *Micromachines*, **8**(101) (2017). Two-photon polymerization metrology: Characterization methods of mechanisms and microstructures.
- [39] A. Ovsianikov, M. Gruene, M. Pflaum, L. Koch, F. Maiorana, M. Wilhelmi, A. Haverich, and B. Chichkov, *Biofabrication*, **2**(1), 014104 (2010). Laser printing of cells into 3D scaffolds.
- [40] T. Weiß, R. Schade, T. Laube, A. Berg, G. Hildebrand, R. Wyrwa, M. Schnabelrauch, and K. Liefelth, *Advanced Engineering Materials*, **13**(9), B264–B273 (2011). Two-photon polymerization of biocompatible photopolymers for microstructured 3D biointerfaces.

- [41] P. Tayalia, C. R. Mendonca, T. Baldacchini, D. J. Mooney, and E. Mazur, *Advanced Materials*, **20**(23), 4494–4498 (2008). 3D cell-migration studies using two-photon engineered polymer scaffolds.
- [42] A. Ovsianikov, S. Schlie, and A. Ngezhayo, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **1**(6), 443–449 (2007). Two-photon polymerization technique for microfabrication of CAD-designed 3D scaffolds from commercially available photosensitive materials.
- [43] M. Malinauskas, A. Zukauskas, and S. Hasegawa, *Light: Science & Applications*, **5**, e16133 (2016). Ultrafast laser processing of materials: from science to industry.
- [44] A. Zukauskas, G. Bataviciute, M. Sciuka, T. Jukna, A. Melninkaitis, and M. Malinauskas, *Optical Materials Express*, **4**(8), 1601 (2014). Characterization of photopolymers used in laser 3D micro/nanolithography by means of laser-induced damage threshold (LIDT).
- [45] S. Rekstyte, A. Zukauskas, V. Purlys, Y. Gordienko, and M. Malinauskas, *Applied Surface Science*, **270**, 382–387 (2013). Direct laser writing of 3D polymer micro/nanostructures on metallic surfaces.
- [46] V. Osipov, V. Pavelyev, D. Kachalov, A. Zukauskas, and B. Chichkov, *Optics Express*, **18**(25), 25808 (2010). Realization of binary radial diffractive optical elements by two-photon polymerization technique.
- [47] J. Stampfl, R. Liska, and A. Ovsianikov, Eds., *Multiphoton lithography*, Wiley-VCH, 2016.
- [48] H. Jeon, E. Kim, and C. Grigoropoulos, *Biomedical Microdevices*, **13**(1), 107–115 (2011). Measurement of contractile forces generated by individual fibroblasts on self-standing fiber scaffolds.
- [49] A. Zukauskas, G. Bataviciute, M. Sciuka, Z. Balevicius, A. Melninkaitis, and M. Malinauskas, *Optical Materials*, **39**, 224–231 (2015). Effect of the photoinitiator presence and exposure conditions on laser-induced damage threshold of ORMOSIL (SZ2080).
- [50] M. Raimondi, S. Eaton, M. Laganà, V. Aprile, M. Nava, G. Cerullo, and R. Osellame, *Acta Biomaterialia*, **9**, 4579–4584 (2013). Three-dimensional structural niches engineered via two-photon laser polymerization promote stem cell homing.
- [51] J. Maciulaitis, M. Deveikyte, S. Rekstyte, M. Bratchikov, A. Darinskas, A. Simbelyte, G. Daunoras, A. Laurinaviciene, A. Laurinavicius, R. Gudas, M. Malinauskas, and R. Maciulaitis, *Biofabrication*, **7**(1), 015015 (2015). Preclinical study of SZ2080 material 3d microstructured scaffolds for cartilage tissue engineering made by femtosecond direct laser writing lithography.
- [52] A. Aumann, S. Ksouri, Q. Guo, C. Sure, E. Gurevich, and A. Ostendorf, *Journal of Laser Applications*, **26**(2), 022002 (2014). Resolution and aspect ratio in two-photon lithography of positive photoresist.

- [53] J. Lewis and G. Gratson, *Materials Today*, **7**(7-8), 32–39 (2004). Direct writing in three dimensions.
- [54] A. Ovsianikov, A. Ostendorf, and B. Chichkov, *Applied Surface Science*, **253**(15), 6599–6602 (2007). Three-dimensional photofabrication with femtosecond lasers for applications in photonics and biomedicine.
- [55] T. Baldacchini, Ed., *Three-dimensional microfabrication using two-photon polymerization*, William Andrew, 2016.
- [56] C. Ho, S. Ng, K. Li, and Y. Yoon, *Lab on a Chip*, **15**(18), 3627–3637 (2015). 3D printed microfluidics for biological applications.
- [57] Y. Han and J. Dong, *Advanced Materials Technologies*, **3**(3), 1700268 (2017). Electrohydrodynamic (EHD) printing of molten metal ink for flexible and stretchable conductor with self-healing capability.
- [58] K. Hon, L. Li, and I. Hutchings, *CIRP Annals - Manufacturing Technology*, **57**(2), 601–620 (2008). Direct writing technology - advances and developments.
- [59] S. Maruo and K. Ikuta, *Sensors and Actuators A: Physical*, **100**(1), 70–76 (2002). Submicron stereolithography for the production of freely movable mechanisms by using single-photon polymerization.
- [60] S. Wong, M. Deubel, P. F., S. John, G. Ozin, M. Wegener, and v. G., *Advanced Materials*, **18**(3), 265–269 (2006). Direct laser writing of three-dimensional photonic crystals with a complete photonic bandgap in chalcogenide glasses.
- [61] Z. Gan, M. Turner, and M. Gu, *Science Advances*, **2**(5), e1600084–e1600084 (2016). Biomimetic gyroid nanostructures exceeding their natural origins.
- [62] X. Wang, A. Kuchmizhak, E. Brasselet, and S. Juodkazis, *Applied Physics Letters*, **110**(18), 181101 (2017). Dielectric geometric phase optical elements fabricated by femtosecond direct laser writing in photoresists.
- [63] V. Osipov, L. Doskolovich, E. Bezus, W. Cheng, A. Gaidukeviciute, and B. Chichkov, *Applied Physics A*, **107**(3), 525–529 (2012). Fabrication of three-focal diffractive lenses by two-photon polymerization technique.
- [64] H. Hidai, D. Hwang, and C. Grigoropoulos, *Applied Physics A*, **93**(2), 443–445 (2008). Self-grown fiber fabrication by two-photon photopolymerization.
- [65] R. Woods, S. Feldbacher, G. Langer, V. Satzinger, V. Schmidt, and W. Kern, *Polymer*, **52**(14), 3031–3037 (2011). Epoxy silicone based matrix materials for two-photon patterning of optical waveguides.
- [66] J. Kumpfmüller, K. Stadlmann, V. Satzinger, Z. Li, J. Stampfl, and R. Liska, *Journal of Laser Micro/Nanoengineering*, **6**(3), 195–198 (2011). Two-photon-induced microfabrication of flexible optical waveguides.
- [67] S. Rekstyte, D. Paipulas, M. Malinauskas, and V. Mizeikis, *Nanotechnology*, **28**(12), 124001 (2017). Microactuation and sensing using reversible deformations of laser-written polymeric structures.

- [68] J. Kim, J. Park, H. Lee, W. Kim, H. Muramatsu, and S. Chang, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **33**, 47–53 (2009). Development of glucose sensor using two-photon adsorbed photopolymerization.
- [69] G. Göring, P. Dietrich, M. Blaicher, S. Sharma, J. Korvink, T. Schimmel, C. Koos, and H. Hölscher, *Applied Physics Letters*, **109**(6), 063101 (2016). Tailored probes for atomic force microscopy fabricated by two-photon polymerization.
- [70] Y. Liu, J. Yang, Y. Nie, C. Lu, E. Huang, C. Shin, P. Baldeck, and C. Lin, *Microfluidics and Nanofluidics*, **18**(3), 427–431 (2015). A simple and direct reading flow meter fabricated by two-photon polymerization for microfluidic channel.
- [71] D. Wu, Q. Chen, L. Niu, J. Wang, J. Wang, R. Wang, H. Xia, and H. Sun, *Lab on a Chip*, **9**(16), 2391–2394 (2009). Femtosecond laser rapid prototyping of nanoshells and suspending components towards microfluidic devices.
- [72] C. Schizas, V. Melissinaki, A. Gaidukeviciute, C. Reinhardt, C. Ohrt, V. Dedoussis, B. Chichkov, C. Fotakis, M. Farsari, and D. Karalekas, *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, **48**(5-8), 435–441 (2010). On the design and fabrication by two-photon polymerization of a readily assembled micro-valve.
- [73] L. Amato, Y. Gu, N. Bellini, S. Eaton, G. Cerullo, and R. Osellame, *Lab on a Chip*, **12**(6), 1135–1142 (2012). Integrated three-dimensional filter separates nanoscale from microscale elements in a microfluidic chip.
- [74] D. Wu, J. Xu, L. Niu, S. Wu, K. Midorikawa, and K. Sugioka, *Light: Science & Applications*, **4**, e228 (2015). In-channel integration of designable microoptical devices using flat scaffold-supported femtosecond-laser microfabrication for coupling-free optofluidic cell counting.
- [75] A. Ovsianikov, B. Chichkov, O. Adunka, H. Pillsbury, A. Doraiswamy, and R. Narayan, *Applied Surface Science*, **253**(15), 6603–6607 (2007). Rapid prototyping of ossicular replacement prostheses.
- [76] R. Wittig, E. Waller, G. Freymann, and R. Steiner, *Journal of Laser Applications*, **24**(4), 042011 (2012). Direct laser writing-mediated generation of standardized topographies for dental implant surface optimization.
- [77] A. Greiner, B. Richter, and M. Bastmeyer, *Macromolecular Bioscience*, **12**(10), 1301–1314 (2012). Micro-Engineered 3D scaffolds for cell culture studies.
- [78] P. Danilevicius, S. Rekstyte, E. Balciunas, A. Kraniauskas, R. Jarasiene, R. Sirmenis, D. Baltriukiene, V. Bukelskiene, R. Gadonas, and M. Malinauskas, *Journal of Biomedical Optics*, **17**(8), 081405 (2012). Micro-structured polymer scaffolds fabricated by direct laser writing for tissue engineering.
- [79] V. Melissinaki, A. Gill, I. Ortega, M. Vamvakaki, A. Ranella, J. Haycock, C. Fotakis, M. Farsari, and F. Claeysens, *Biofabrication*, **3**(4), 045005 (2011). Direct laser writing of 3D scaffolds for neural tissue engineering applications.

- [80] S. Turunen, E. Käpylä, M. Lähteenmäki, Y. L. S. Narkilahti, and M. Kellomäki, *Optics and Lasers in Engineering*, **55**, 197–204 (2014). Direct laser writing of microstructures for the growth guidance of human pluripotent stem cell derived neuronal cells.
- [81] R. Donnelly, T. Singh, and W. A. delivery, *Drug Deliv.*, **17**(4), 187–207 (2010). Microneedle-based drug delivery systems: microfabrication, drug delivery, and safety.
- [82] S. Gittard, B. Chen, H. Xu, A. Ovsianikov, B. Chichkov, M. Nancy, and R. Narayan, *Journal of Adhesion Science and Technology*, **27**(3), 227–243 (2013). The effects of geometry on skin penetration and failure of polymer microneedles.
- [83] P. Miller, M. Moorman, R. Manginell, C. Ashlee, I. Brener, D. Wheeler, R. Narayan, and R. Polsky, *Electroanalysis*, **28**(6), 1147–1400 (2016). Towards an integrated microneedle total analysis chip for protein detection.
- [84] H. Wang, G. Pastorin, and C. Lee, *Advanced Science*, **3**(9), 1500441 (2016). Toward self-powered wearable adhesive skin patch with bendable microneedle array for transdermal drug delivery.
- [85] S. Paik, S. Byun, J. Lim, Y. Park, A. Lee, S. Chung, J. Chang, K. Chun, and D. Cho, *Sensors and Actuators A: Physical*, **114**(2-3), 276–284 (2004). In-plane single-crystal-silicon microneedles for minimally invasive microfluid systems.
- [86] B. Kim, K. Seong, I. You, V. Selvaraj, S. Yim, O. Eoin, U. Jeong, and S. Yang, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **256**, 18–26 (2018). Touch-actuated transdermal delivery patch for quantitative skin permeation control.
- [87] Z. Kuang, D. Liu, W. Perrie, S. Edwardson, M. Sharp, E. Fearon, G. Dearden, and K. Watkins, *Applied Surface Science*, **255**(13-14), 6582–6588 (2009). Fast parallel diffractive multi-beam femtosecond laser surface micro-structuring.
- [88] K. Obata, J. Koch, U. Hinze, and B. Chichkov, *Optics Express*, **18**(16), 17193–17200 (2010). Multi-focus two-photon polymerization technique based on individually controlled phase modulation.
- [89] H. Lin, B. Jia, and M. Gu, *Optics Letters*, **36**(13), 2471 (2011). Generation of an axially super-resolved quasi-spherical focal spot using an amplitude-modulated radially polarized beam.
- [90] L. Yang, E. Ayman, U. Hinze, J. Li, Y. Hu, W. Huang, J. Chu, and B. Chichkov, *Applied Physics Letters*, **105**(4), 041110 (2014). Two-photon polymerization of cylinder microstructures by femtosecond besel beams.
- [91] Z. Kuang, W. Perrie, D. Liu, S. Edwardson, Y. Jiang, E. Fearon, K. Watkins, and G. Dearden, *Applied Surface Science*, **273**, 101–106 (2013). Ultrafast laser parallel microprocessing using high uniformity binary dammann grating generated beam array.

- [92] L. Yang, A. El-Tamer, U. Hinze, J. Li, Y. Hu, W. Huang, J. Chu, and B. N. Chichkov, *Optics and Laser in Engineering*, **70**, 26–32 (2015). Parallel direct laser writing of micro-optical and photonic structures using spatial light modulator.
- [93] H. Lin, B. Jia, and M. Gu, *Optics Letters*, **36**(3), 406 (2011). Dynamic generation of debye diffraction-limited multifocal arrays for direct laser printing nanofabrication.
- [94] J. Wang, A. Goyanes, S. Gaisford, and A. Basit, *International Journal of Pharmaceutics*, **503**(1-2), 207–212 (2016). Stereolithographic (SLA) 3D printing of oral modified-release dosage forms.
- [95] V. Morris, S. Nimbalkar, M. Younesi, M. Phillip, and O. Akkus, *Annals of Biomedical Engineering*, **45**(1), 286–296 (2016). Mechanical properties, cytocompatibility and manufacturability of Chitosan:PEGDA Hybrid-Gel scaffolds by stereolithography.
- [96] Z. Weng, Y. Zhou, W. Lin, T. Senthil, and L. Wu, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, **88**, 234–242 (2016). Structure-property relationship of nano enhanced stereolithography resin for desktop SLA 3D printer.
- [97] Y. Zhang, Q. Chen, H. Xia, and H. Sun, *Nano Today*, **5**(5), 435–448 (2010). Designable 3D nanofabrication by femtosecond laser direct writing.
- [98] G. Freymann, A. Ledermann, M. Thiel, I. Staude, S. Essig, K. Busch, and M. Wegener, *Advanced Functional Materials*, **20**(7), 1038–1052 (2010). Three-Dimensional nanostructures for photonics.
- [99] A. Ovsianikov, M. Malinauskas, S. Schlie, B. Chichkov, S. Gittard, R. Narayan, M. Löbner, K. Sternberg, K. Schmitz, and A. Haverich, *Acta Biomaterialia*, **7**(3), 967–974 (2011). Three-dimensional laser micro- and nano-structuring of acrylated poly(ethylene glycol) materials and evaluation of their cytotoxicity for tissue engineering applications.
- [100] T. Stichel, B. Hecht, R. Houbertz, and G. Söttl, *Applied Physics A*, **121**(1), 187–191 (2015). Compensation of spherical aberration influences for two-photon polymerization patterning of large 3D scaffolds.
- [101] T. Scott, C. Kloxin, D. Forman, M. Robert, and C. Bowman, *Journal of Materials Chemistry*, **21**(37), 14150–14155 (2011). Principles of voxel refinement in optical direct write lithography.
- [102] A. Ovsianikov, A. Deiwick, S. Vlierberghe, P. Dubruel, L. Möller, G. Dräger, and B. Chichkov, *Biomacromolecules*, **12**(4), 851–858 (2011). Laser fabrication of Three-Dimensional CAD scaffolds from photosensitive gelatin for applications in tissue engineering.
- [103] K. König and A. Ostendorf, Eds., *Optically Induced Nanostructures: Biomedical and Technical Applications*, De Gruyter, 2015.
- [104] M. Jin, H. Hong, J. Xie, J. Malval, A. Spangenberg, O. Soppera, D. Wan, H. Pu, D. Versace, T. Leclerc, P. Baldeck, O. Poizat, and S. Knopf, *Polymer Chemistry*, **5**(16), 4747–4755 (2014). π -conjugated sulfonium-based photoacid generators: an integrated molecular approach for efficient one and two-photon polymerization.

- [105] M. Jin, X. Wu, J. Xie, J. Malval, and D. Wan, *RSC Advances*, **5**(68), 55340–55347 (2015). One/two-photon-sensitive photoacid generators based on benzene oligomer-containing D- π -A-type aryl dialkylsulfonium salts.
- [106] E. Balciunas, L. Jonusauskas, V. Valuckas, D. Baltriukiene, V. Bukelskiene, R. Galdonas, and M. Malinauskas, *Proceedings of SPIE*, **8427**, 84271X (2012). Lithographic microfabrication of biocompatible polymers for tissue engineering and lab-on-a-chip applications.
- [107] Z. Chowdhury and R. Fedosejevs, *Microsystem Technologies*, **14**(1), 59–67 (2007). Two photon absorption coefficients and processing parameters for photoresists.
- [108] Y. Liu, D. Nolte, and P. Laura, *Applied Physics A*, **100**(1), 181–191 (2010). Large-format fabrication by two-photon polymerization in SU-8.
- [109] W. Teh, U. Dürig, G. Salis, R. Harbers, U. Drechsler, R. Mahrt, C. Smith, and H. Güntherodt, *Applied Physics Letters*, **84**(20), 4095–4097 (2004). SU-8 for real three-dimensional subdiffraction-limit two-photon microfabrication.
- [110] E. Lemma, F. Rizzi, T. Dattoma, B. Spagnolo, L. Sileo, A. Qualtieri, M. Vittorio, and F. Pisanello, *IEEE Transactions on Nanotechnology*, **16**(1), 23–31 (2016). Mechanical properties tunability of three-dimensional polymeric structures in two-photon lithography.
- [111] J. Bauer, S. Hengsbach, I. Tesari, R. Schwaiger, and O. Kraft, *PNAS*, **111**(7), 2453–2458 (2014). High-strength cellular ceramic composites with 3D microarchitecture.
- [112] A. Accardo, M.-C. Blatche, R. Courson, I. Loubinoux, C. Thibault, L. Malaquin, and C. Vieu, *Small*, **13**(27), 1700621 (2017). Multiphoton direct laser writing and 3d imaging of polymeric freestanding architectures for cell colonization.
- [113] T. Bückmann, N. Stenger, M. Kadic, J. Kaschke, A. Frölich, T. Kennerknecht, C. Eberl, M. Thiel, and M. Wegener, *Advanced Materials*, **24**(20), 2710–2714 (2012). Tailored 3D mechanical metamaterials made by dip-in Direct-Laser-Writing optical lithography.
- [114] V. Cadarso, K. Pfeiffer, U. Ostrzinski, A. Voigt, G. Gruetzner, and J. Brugger, *16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, pages 1813–1815 (2012). Fast prototyping of μ TAS by direct laser writing.
- [115] S. Hemanth, T. Anhøj, C. Caviglia, and S. Keller, *Microelectronic Engineering*, **176**, 40–44 (2017). Suspended microstructures of epoxy based photoresists fabricated with UV photolithography.
- [116] M. Cheri, H. Latifi, F. Aghbolagh, O. Naeini, M. Taghavi, and M. Ghaderi, *Applied Optics*, **52**(14), 3420 (2013). Fabrication, characterization, and simulation of a cantilever-based airflow sensor integrated with optical fiber.
- [117] A. Marino, J. Barsotti, G. Vito, C. Filippeschi, B. Mazzolai, V. Piazza, M. Labardi, V. Mattoli, and G. Ciofani, *ACS Applied Materials & Interfaces*, **7**(46), 25574–25579 (2015). Two-Photon lithography of 3D nanocomposite piezoelectric scaffolds for cell stimulation.

- [118] A. Greiner, F. Klein, T. Gudzenko, B. Richter, T. Striebel, B. Wundari, T. Autenrieth, M. Wegener, C. Franz, and M. Bastmeyer, *Biomaterials*, **69**, 121–132 (2015). Cell type-specific adaptation of cellular and nuclear volume in micro-engineered 3D environments.
- [119] V. E. Stryland and S. M., *Characterization Techniques and Tabulations for Organic Nonlinear Materials*, CRC Press, 1998.
- [120] C. de Araújo, A. Gomes, and G. Boudebs, *Reports on Progress in Physics*, **79** (2016). Techniques for nonlinear optical characterization of materials: a review.
- [121] Y. Boiko, *Journal of Nonlinear Optical Physics and Materials*, **14**(1), 79–84 (2005). Z-Scan approach for measuring the threshold of Two-Photon photopolymerization.
- [122] A. Ajami, W. Husinsky, R. Liska, and N. Pucher, *Journal of the Optical Society of America B*, **27**(11), 2290–2297 (2010). Two-photon absorption cross section measurements of various two-photon initiators for ultrashort laser radiation applying the z-scan technique.
- [123] K. Kamada, K. Matsunaga, A. Yoshino, and K. Ohta, *Journal of the Optical Society of America B*, **20**(3), 529–537 (2003). Two-photon-absorption-induced accumulated thermal effect on femtosecond z-scan experiments studied with time-resolved thermal-lens spectrometry and its simulation.
- [124] C. Colley, D. Grills, N. Besley, S. Jockusch, P. Matousek, A. Parker, M. Towrie, N. Turro, P. Gill, and M. George, *Journal of the American Chemical Society*, **124**(50), 14952–14958 (2002). Probing the reactivity of photoinitiators for free radical polymerization: Time-resolved infrared spectroscopic study of benzoyl radicals.
- [125] M. Malinauskas, P. Danilevicius, and S. Juodkazis, *Optics Express*, **19**(6), 5602–5610 (2011). Three-dimensional micro-/nano-structuring via direct write polymerization with picosecond laser pulses.
- [126] T. Baldacchini, S. Snider, and R. Zadayan, *Optics Express*, **20**(28), 29890–29899 (2012). Two-photon polymerization with variable repetition rate bursts of femtosecond laser pulses.
- [127] J. Fischer, J. Mueller, J. Kaschke, T. Wolf, A. Unterreiner, and M. Wegener, *Optics Express*, **21**(22), 26244–26260 (2013). Three-dimensional multi-photon direct laser writing with variable repetition rate.
- [128] Z. Tomova, N. Liaros, S. Razo, S. Wolf, and J. Fourkas, *Laser & Photonics Reviews*, **10**(5), 849–854 (2016). In situ measurement of the effective nonlinear absorption order in multiphoton photoresists.
- [129] L. Kelemen, S. Valkai, and P. Ormos, *Optics Express*, **15**(22), 14488 (2007). Parallel photopolymerisation with complex light patterns generated by diffractive optical elements.
- [130] R. Winfield, B. Bhuian, S. O'Brien, and G. Crean, *Applied Surface Science*, **253**(19), 8086–8090 (2007). Fabrication of grating structures by simultaneous multi-spot fs laser writing.

- [131] S. Matsuo, S. Juodkazis, and H. Misawa, *Applied Physics A*, **80**(4), 683–685 (2005). Femtosecond laser microfabrication of periodic structures using a microlens array.
- [132] L. Li and J. Fourkas, *Materials Today*, **10**(6), 30–37 (2007). Multiphoton polymerization.
- [133] H. Lin and M. Gu, *Applied Physics Letters*, **102**(8), 084103 (2013). Creation of diffraction-limited non-Airy multifocal arrays using a spatially shifted vortex beam.
- [134] L. Yang, D. Qian, C. Xin, Z. Hu, S. Ji, D. Wu, Y. Hu, J. Li, W. Huang, and J. Chu, *Applied Physics Letters*, **110**(22), 221103 (2017). Direct laser writing of complex microtubes using femtosecond vortex beams.
- [135] S. Zwick, T. Haist, M. Warber, and O. W. optics, *Applied Optics*, **49**(25), 47–58 (2010). Dynamic holography using pixelated light modulators.
- [136] E. Lueder, *Liquid Crystal Displays*, Wiley, 2010.
- [137] C. Slinger, C. Cameron, and M. Stanley, *Computer*, **38**, 46–53 (2005). Computer-generated holography as a generic display technology.
- [138] A. Jesacher, A. Schwaighofer, S. Fürhapter, C. Maurer, S. Bernet, and M. Ritsch-Marte, *Optics Express*, **15**(9), 5801 (2007). Wavefront correction of spatial light modulators using an optical vortex image.
- [139] G. Thalhammer, R. Bowman, G. Love, M. Padgett, and M. Ritsch-Marte, *Optics Express*, **21**(2), 1779 (2013). Speeding up liquid crystal SLMs using overdrive with phase change reduction.
- [140] R. Gerchberg and W. Saxton, *Optik*, **35**(2), 237–246 (1972). A practical algorithm for the determination of phase from image and diffraction plane pictures.
- [141] N. Jenness, K. Wulff, M. Johannes, M. Padgett, D. Cole, and R. Clark, *Optics Express*, **16**(20), 15942 (2008). Three-dimensional parallel holographic micropatterning using a spatial light modulator.
- [142] G. Yang, B. Dong, B. Gu, J. Zhuang, and O. Ersoy, *Applied Optics*, **33**(2), 209–218 (1994). Gerchberg-Saxton and Yang-Gu algorithms for phase retrieval in a nonunitary transform system: a comparison.
- [143] T. Clark, R. Offer, F. Sonja, A. Arnold, and N. Radwell, *Optics Express*, **24**(6), 6249–6264 (2016). Comparison of beam generation techniques using a phase only spatial light modulator.
- [144] J. Leach, K. Wulff, G. Sinclair, P. Jordan, J. Courtial, L. Thomson, G. Gibson, K. Karunwi, J. Cooper, Z. Laczik, and M. Padgett, *Applied Optics*, **45**(5), 897–903 (2006). Interactive approach to optical tweezers control.
- [145] R. Bowman, D. V., E. Rubino, O. Jedrkiewicz, P. Trapani, and M. Padgett, *The European Physical Journal Special Topics*, **199**(1), 149–158 (2011). Optimisation of a low cost SLM for diffraction efficiency and ghost order suppression.

- [146] L. Sima, E. Buruiana, T. Buruiana, A. Matei, G. Epurescu, M. Zamfirescu, A. Moldovan, S. Petrescu, and M. Dinescu, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **7**(2), 129–138 (2013). Dermal cells distribution on laser-structured ormosils.
- [147] A. Matei, M. Dinescu, E. Buruiana, T. Buruiana, I. Petcu, and C. Mustaciosu, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, **6**, 29–35 (2011). Ormosils scaffolds produced by laser processing for fibroblast cell growth.
- [148] T. Stichel, B. Hecht, R. Houbertz, and G. Sextl, *Journal of Laser Micro/Nanoengineering*, **5**(3), 209–212 (2010). Two-photon polymerization as method for the fabrication of large scale biomedical scaffold applications.
- [149] A. Bell, M. Kofron, and V. Nistor, *Biofabrication*, **7**(3), 035007 (2015). Multiphoton crosslinking for biocompatible 3d printing of type i collagen.
- [150] L. Brigo, A. Urciuolo, S. Giulitti, G. Giustina, M. Tromayer, R. Liska, N. Elvassore, and G. Brusatin, *Acta Biomaterialia*, **55**, 373–384 (2017). 3d high-resolution two-photon crosslinked hydrogel structures for biological studies.
- [151] P. Danilevicius, L. Georgiadi, C. J. Pateman, F. Claeysens, M. Chatzinikolaidou, and M. Farsari, *Applied Surface Science*, **336**, 2–10 (2015). The effect of porosity on cell ingrowth into accurately defined, laser-made, polylactide-based 3d scaffolds.
- [152] K. Sugioka, *Nanophotonics*, **6**(2), 393–413 (2016). Progress in ultrafast laser processing and future prospects.
- [153] S. Gittard, A. Nguyen, K. Obata, A. Koroleva, R. Narayan, and B. Chichkov, *Biomedical Optics Express*, **2**(11), 3167 (2011). Fabrication of microscale medical devices by two-photon polymerization with multiple foci via a spatial light modulator.
- [154] L. Jonusauskas, S. Rekstyte, and M. Malinauskas, *Optical Engineering*, **53**(12), 125102 (2014). Augmentation of direct laser writing fabrication throughput for three-dimensional structures by varying focusing conditions.
- [155] M. Chatzinikolaidou, C. Pontikoglou, K. Terzaki, M. Kaliva, A. Kalyva, E. Papadaki, M. Vamvakaki, and M. Farsari, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **149**, 233–242 (2017). Recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) immobilized on laser-fabricated 3D scaffolds enhance osteogenesis.
- [156] A. Greiner, M. Jäckel, A. Scheiwe, D. Stamow, T. Autenrieth, J. Lahann, C. Franz, and M. Bastmeyer, *Biomaterials*, **35**(2), 611–619 (2014). Multifunctional polymer scaffolds with adjustable pore size and chemoattractant gradients for studying cell matrix invasion.
- [157] P. Danilevicius, S. Rekstyte, E. Balciunas, A. Kraniauskas, R. Sirmenis, D. Baltrukiene, V. Bukelskiene, R. Gadonas, V. Sirvydis, A. Piskarskas, and M. Malinauskas, *Optics & Laser Technology*, **45**, 518–524 (2013). Laser 3d micro/nanofabrication of polymers for tissue engineering applications.

- [158] S. Schlie, A. Ngezahayo, A. Ovsianikov, H. A. Fabian, T. and Kolb, H. Haferkamp, and B. N. Chichkov, *Journal of Biomaterials Applications*, **22**(3), 275–287 (2007). Three-dimensional cell growth on structures fabricated from ORMOCER® by two-photon polymerization technique.
- [159] P. Sergi, A. Marino, and G. Ciofani, *Integrative Biology*, **7**(10), 1242–1252 (2015). Deterministic control of mean alignment and elongation of neuron-like cells by grating geometry: a computational approach.
- [160] A. Doraiswamy, C. Jin, R. Narayan, P. Mageswaran, P. Mente, R. Modi, R. Auyeung, D. Chrisey, A. Ovsianikov, and B. Chichkov, *Acta Biomaterialia*, **2**(3), 267–275 (2006). Two photon induced polymerization of organic-inorganic hybrid biomaterials for microstructured medical devices.
- [161] H. Hidai, H. Jeon, D. Hwang, and C. Grigoropoulos, *Biomedical Microdevices*, **11**(3), 643–652 (2009). Self-standing aligned fiber scaffold fabrication by two photon photopolymerization.
- [162] M. Mao, J. He, X. Li, B. Zhang, Q. Lei, Y. Liu, and D. Li, *Micromachines*, **8**(4), 113 (2017). The emerging frontiers and applications of high-resolution 3d printing.
- [163] G. Vizsnyiczai, L. Kelemen, and P. Ormos, *Optics Express*, **22**(20), 24217–24223 (2014). Holographic multi-focus 3D two-photon polymerization with real-time calculated holograms.
- [164] A. Trautmann, M. R  th, H. Lemke, T. Walther, and R. Hellmann, *Optics & Laser Technology*, **106**, 474–480 (2018). Two-photon polymerization based large scaffolds for adhesion and proliferation studies of human primary fibroblasts.
- [165] L. Jonauskas, S. Rekstyte, R. Buividas, S. Butkus, R. Gadonas, S. Juodkazis, and M. Malinauskas, *Optical Engineering*, **56**(9), 094108 (2017). Hybrid subtractive-additive-welding microfabrication for lab-on-chip applications via single amplified femtosecond laser source.
- [166] T. Tickunas, M. Perrenoud, S. Butkus, R. Gadonas, S. Rekstyte, M. Malinauskas, D. Paipulas, Y. Bellouard, and V. Sirutkaitis, *Optics Express*, **25**(21), 26280 (2017). Combination of additive and subtractive laser 3d microprocessing in hybrid glass/polymer microsystems for chemical sensing applications.
- [167] M. Malinauskas, L. Lukosevicius, D. Mackeviciute, E. Balciunas, S. Rekstyte, and D. Paipulas, *Proceedings of SPIE*, **9135**, 91350T (2014). Multiscale 3d manufacturing: combining thermal extrusion printing with additive and subtractive direct laser writing.
- [168] L. Jonauskas, E. Skliutas, S. Butkus, and M. Malinauskas, *Lithuanian Journal of Physics*, **55**(3), 227–236 (2015). Custom on demand 3d printing of functional microstructures.
- [169] N. Lai, J. Lin, W. Liang, C. Hsu, and C. Lin, *Applied Optics*, **45**(22), 5777–5782 (2006). Precisely introducing defects into periodic structures by using a double-step laser scanning technique.

- [170] J. Lee and D. Cho, *Current Pharmaceutical Design*, **21**(12), 1606–1617 (2015). 3d printing technology over a drug delivery for tissue engineering.
- [171] C. Mota, D. Puppi, F. Chiellini, and E. Chiellini, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **9**(3), 174–190 (2015). Additive manufacturing techniques for the production of tissue engineering constructs.
- [172] T. Tani, *U.S. patent 6,841,340* (11.01.2005). Optical fabrication method and apparatus.
- [173] S. Zhang, Y. Li, Z. Liu, J. Ren, Y. Xiao, H. Yang, and Q. Gong, *Applied Physics Letters*, **105**(6), 061101 (2014). Two-photon polymerization of a three dimensional structure using beams with orbital angular momentum.
- [174] H. Ren, H. Lin, X. Li, and M. Gu, *Optics Letters*, **39**(6), 1621 (2014). Three-dimensional parallel recording with a debye diffraction-limited and aberration-free volumetric multifocal array.
- [175] R. Houbertz-Krauß, T. Stichel, and S. Steenhusen, *Deutsches Patent DE 10 2010 020 158 A1* (17.11.2011). Vorrichtung sowie Verfahren zur Erzeugung dreidimensionaler Strukturen.
- [176] R. Hellmann and A. Trautmann, *Europäisches Patent EP 3 208 075 B1* (13.06.2018). Optical method and apparatus for fabricating a structured object.
- [177] A. Singh, G. Scotti, T. Sikanen, V. Jokinen, and S. Franssila, *Micromachines*, **5**(3), 472–485 (2014). Laser direct writing of thick hybrid polymers for microfluidic chips.
- [178] N. Roos, T. Luxbacher, and T. Glinsner, *Proceedings of SPIE*, **4343**, 427–435 (2001). Nanoimprint lithography with a commercial 4-inch bond system for hot embossing.
- [179] S. Xie, Z. Li, and Z. Yu, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **28**, 11–17 (2015). Microneedles for transdermal delivery of insulin.
- [180] R. Donnelly and E. Larrañeta, *Drug Discovery Today*, **23**(5), 1026–1033 (2018). Microarray patches: potentially useful delivery systems for long-acting nanosuspensions.
- [181] Y. Kim, J. Park, and M. Prausnitz, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **64**(14), 1547–1568 (2012). Microneedles for drug and vaccine delivery.
- [182] K. Maaden, J. Heuts, M. Camps, M. Pontier, A. Scheltinga, W. Jiskoot, F. Ossendorp, and J. Bouwstra, *Journal of Controlled Release*, **269**, 347–354 (2018). Hollow microneedle-mediated micro-injections of a liposomal HPV E7_{43–63} synthetic long peptide vaccine for efficient induction of cytotoxic and t-helper responses.
- [183] E. Caffarel-Salvador, T.-M. Tuan-Mahmood, J. McElnay, M. Helen, K. Mooney, A. Woolfson, and R. Donnelly, *International Journal of Pharmaceutics*, **489**(1–2), 158–169 (2015). Potential of hydrogel-forming and dissolving microneedles for use in paediatric populations.

- [184] E. Mukerjee, S. Collins, R. Isseroff, and R. Smith, *Sensors and Actuators A: Physical*, **114**(2-3), 267–275 (2004). Microneedle array for transdermal biological fluid extraction and in situ analysis.
- [185] E. Larraneta, R. Lutton, A. Woolfson, and R. Donnelly, *Materials Science and Engineering R*, **104**, 1–32 (2016). Microneedle arrays as transdermal and intra-dermal drug delivery systems: materials science, manufacture and commercial development.
- [186] U. Shah, M. Roberts, M. Gul, C. Tuleu, M. Beresford, and o. Group, *International Journal of Pharmaceutics*, **416**(1), 1–11 (2011). Needle-free and microneedle drug delivery in children: a case for disease-modifying antirheumatic drugs (dmards).
- [187] J. Gupta, S. Park, B. Bondy, E. Felner, and M. Prausnitz, *Biomaterials*, **32**(28), 6823–6831 (2011). Infusion pressure and pain during microneedle injection into skin of human subjects.
- [188] D. Lim, J. Vines, H. Park, and S. Lee, *International Journal of Biological Macromolecules*, **110**, 30–38 (2018). Microneedles: A versatile strategy for transdermal delivery of biological molecules.
- [189] K. Ita, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **29**, 16–23 (2015). Transdermal delivery of drugs with microneedles: strategies and outcomes.
- [190] S. Bal, J. Caussin, S. Pavel, and J. Bouwstra, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **35**(3), 193–202 (2008). In vivo assessment of safety of microneedle arrays in human skin.
- [191] H. Gill and M. Prausnitz, *Journal of Controlled Release*, **117**(2), 227–237 (2007). Coated microneedles for transdermal delivery.
- [192] M. Ling and M. Chen, *Acta Biomaterialia*, **9**(11), 8952–8961 (2013). Dissolving polymer microneedle patches for rapid and efficient transdermal delivery of insulin to diabetic rats.
- [193] D. Zhu, Q. Wang, X. Liu, and X. Guo, *Acta Biomaterialia*, **41**, 312–319 (2016). Rapidly separating microneedles for transdermal drug delivery.
- [194] A. Doraiswamy, A. Ovsianikov, S. Gittard, M. Nancy, R. Crombez, E. Montalvo, W. Shen, B. Chichkov, and R. Narayan, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **10**(10), 6305–6312 (2010). Fabrication of microneedles using two photon polymerization for transdermal delivery of nanomaterials.
- [195] P. Miller, R. Boehm, S. Skoog, T. Edwards, M. Rodriguez, S. Brozik, I. Brener, T. Byrd, J. Baca, C. Ashley, R. Narayan, and R. Polsky, *Electroanalysis*, **27**(9), 2239–2249 (2015). Electrodeposited iron as a biocompatible material for microneedle fabrication.
- [196] X. Kong and C. Wu, *Journal of Bionic Engineering*, **6**(2), 143–152 (2009). Measurement and prediction of insertion force for the mosquito fascicle penetrating into human skin.

- [197] H. Izumi, M. Suzuki, S. Aoyagi, and T. Kanzaki, *Sensors and Actuators A: Physical*, **165**(1), 115–123 (2011). Realistic imitation of mosquito's proboscis: electrochemically etched sharp and jagged needles and their cooperative inserting motion.
- [198] M. Ashraf, S. Tayyaba, N. Afzulpurkar, A. Nisar, E. Bohez, T. Lomas, and A. Tuantranont, *ECTI Transactions on Electrical Engineering, Electronics, and Communications*, **9**(1), 83–91 (2010). Design simulation and fabrication of silicon microneedles for bio-medical applications.
- [199] F. Sammoura, J. Kang, Y. Heo, T. Jung, and L. Lin, *Microsystem Technologies*, **13**(5-6), 517–522 (2007). Polymeric microneedle fabrication using a microinjection molding technique.
- [200] Z. Rad, R. Nordon, C. Anthony, L. Bilston, P. Prewett, J. Arns, C. Arns, L. Zhang, and G. Davies, *Microsystems & Nanoengineering*, **3**, 17034 (2017). High-fidelity replication of thermoplastic microneedles with open microfluidic channels.
- [201] G. Roth, C. Esen, and R. Hellmann, *Optics Express*, **25**(15), 18442–18450 (2017). Femtosecond laser direct generation of 3D-microfluidic channels inside bulk PMMA.
- [202] A. Baum, P. J. Scully, D. Perrie, D. Liu, and V. Lucarini, *Journal of the Optical Society of America B*, **27**(1), 107–111 (2010). Mechanisms of femtosecond laser-induced refractive index modification of poly (methyl methacrylate).
- [203] S. Davis, B. Landis, Z. Adams, M. Allen, and M. Prausnitz, *Journal of Biomechanics*, **37**(8), 1155–1163 (2004). Insertion of microneedles into skin: measurement and prediction of insertion force and needle fracture force.
- [204] N. Roxhed, T. Gasser, P. Griss, G. Holzapfel, and G. Stemme, *Journal of Microelectromechanical Systems*, **16**(6), 1429–1440 (2007). Penetration-enhanced ultrasharp microneedles and prediction on skin interaction for efficient transdermal drug delivery.

CURRICULUM VITÆ

PERSÖNLICHE DATEN

Anika Trautmann

E-Mail: anika.trautmann@h-ab.de

Geburtstag: 01. August 1988

Geburtsort: Aschaffenburg

WISSENSCHAFTLICHER MITARBEITER

2014–2018 Hochschule Aschaffenburg,
Arbeitsgruppe Angewandte Lasertechnik und Photonik
(betreut von Prof. Dr. Ralf Hellmann)

DOKTORAND

2014–2018 Technische Universität Darmstadt,
Institut für Angewandte Physik
(betreut von Prof. Dr. Thomas Walther)

STUDIUM

2011–2013 Master of Science in Physik
Technische Universität Darmstadt

2008–2011 Bachelor of Science in Physik
Technische Universität Darmstadt

SCHULBILDUNG

1999–2008 Abitur
Maria Ward Schule Aschaffenburg

1995–1999 Grundschule Sulzbach a. Main

15. 01. 2019

VERÖFFENTLICHUNGEN UND TAGUNGSBEITRÄGE

PUBLIKATIONEN IN INTERNATIONALEN, BEGUTACHTETEN FACHZEITSCHRIFTEN

- A. Trautmann, M. RÜth, H.-D. Lemke, T. Walther, R. Hellmann, *Optics & Laser Technology* **106**, 474-480 (2018)
„Two-photon polymerization based large scaffolds for adhesion and proliferation studies of human primary fibroblasts“
- A. Trautmann, B. Götzendorfer, T. Walther, R. Hellmann, *Optics Express* **26**(23), 29659-29668 (2018)
„Scaffolds in a shell - a new approach combining one-photon and two-photon polymerization“
- A. Trautmann, G.-L. Roth, B. Nuijqi, T. Walther, R. Hellmann, *Microsystems & Nanoengineering*, eingereicht (2018)
„Towards a versatile point-of-care system combining femtosecond laser generated microfluidic channels and direct laser written microneedle arrays“

PATENTE

- R. Hellmann, A. Trautmann
Europäisches Patent **EP 3 208 075 B1** (13.06.2018)
„Optical method and apparatus for fabricating a structured object“

BEITRÄGE ZU INTERNATIONALEN TAGUNGEN

- A. Trautmann, M. RÜth, H.-D. Lemke, T. Walther, R. Hellmann, *Proc. SPIE* **10456**, Nanophotonics Australasia 2017, 104565A, Melbourne, Australien (2018) (Poster und Konferenzpaper)
„Large 3D direct laser written scaffolds for tissue engineering applications“
ausgezeichnet als „Best student paper (poster)“

BEITRÄGE ZU NATIONALEN TAGUNGEN

- A. Trautmann, Bayerischer Patentkongress 2017, München (2017) (Vortrag)
„Wie bringe ich den 3D-Druck aus der Nano-/Mikrowelt in die Anwendung?“
- A. Trautmann, M. Bachmann, T. Walther, R. Hellmann, Bad Honnef Physics School Applied Photonics, Bad Honnef (2017) (Poster)
„3D direct laser writing of medical devices with shortened process duration“
ausgezeichnet als bestes Poster

- A. Trautmann, R. Hellmann, T. Walther
Verhandl. DPG (VI) **50,4/Q66.4**, Heidelberg (2015) (Vortrag)
„Fabrication and characterization of 3D direct laser written structures using 515 nm and 780 nm“

SONSTIGE VERÖFFENTLICHUNGEN

- A. Trautmann, I. Stevanovic
Physik Journal **16**, 11 (2017) (Tagungsbericht)
„Bad Honnef Physics School Applied Photonics“